

**MODIFIKATION VON RIBONUCLEINSÄUREN IN
MIKROORGANISMEN DURCH BASENSPEZIFISCHE
METHYLTRANSFERASEN:
VERÄNDERUNGEN UNTER DEM EINFLUSS
VON ANTIBIOTIKA**

von

Hans-Henning Arnold

aus

Lauterburg

1973

**MODIFIKATION VON RIBONUCLEINSÄUREN IN
MIKROORGANISMEN DURCH BASENSPEZIFISCHE
METHYLTRANSFERASEN:
VERÄNDERUNGEN UNTER DEM EINFLUSS
VON ANTIBIOTIKA**

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

zur

Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt

von

Hans-Henning Arnold

aus

Lauterburg

Als Dissertation genehmigt von der Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Universität Erlangen - Nürnberg.



Tag der mündlichen Prüfung: 28. 11. 1973

Dekan: Prof. Dr. J. Christiansen

Erstberichterstatter: Prof. Dr. H. Kersten

Zweitberichterstatter: Prof. Dr. O. Dann

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für
Physiologische Chemie der Universität
Erlangen - Nürnberg durchgeführt.

Für die Anregung dieser Arbeit und die stets freundliche Unterstützung, sowie für das mir jederzeit entgegengebrachte Verständnis danke ich Frau Professor Dr. H. Kersten sehr herzlich.

Zu Dank bin ich auch Herrn Professor Dr. W. Kersten für die vielfältige Förderung bei der Durchführung dieser Arbeit verpflichtet.

Für hilfreiche Diskussionen und zahlreiche Anregungen danke ich allen Mitarbeitern des Institutes.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

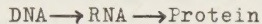
Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	12
2.1.	Material und Geräte	12
2.2.	Züchtung und Wachstum der Bakterien	14
2.3.	Aufschluß der Bakterien und Gewinnung der Gesamtnucleinsäuren	15
2.4.	Präparation der Gesamt-tRNA	16
2.5.	Präparation von Enzymextrakten aus Bakterien	20
2.6.	Aminoacylierung der tRNA	20
2.6.1.	Präparative Aminoacylierung	21
2.7.	Methylierung isolierter tRNA	23
2.7.1.	Untersuchung der Aktivität von Methyltransferasen	23
2.8.	Säulenchromatographien zur Trennung von Ribonucleinsäuren und Isolierung spezifischer und isoacceptierender tRNAs	25
2.8.1.	MAK-Chromatographie	25
2.8.2.	Chromatographie an BD-Cellulose	27
2.8.3.	Reversed-Phase-Chromatographie	30
2.8.4.	Schema zur Isolierung reiner tRNAs	32
3.	Ergebnisse	33
3.1.	Die Bestimmung der Basenspezifität	33
3.1.1.	Verschiedene Methoden	33
3.1.1.1.	Markierung mit radioaktivem Methionin	34
3.1.1.2.	Hydrolysen	34
3.1.1.3.	Entsalzung des Hydrolysates	38
3.1.1.4.	Trennung der Komponenten des Hydrolysates	39
3.1.1.5.	Nachweis und Identifizierung der Bestand- teile	45

3.1.2.	Auswahl der verwendeten Methode	45
3.1.3	Kritik der Methode	52
3.2.	Die methylierten Basen der tRNA in Mikroorganismen	55
3.2.1.	B. subtilis W 23 (Wildtyp)	55
3.2.2.	met ⁻ ind ⁻ rel ⁺ Mutante von B. subtilis	60
3.2.3.	E. coli MRE 600	60
3.3.	tRNA Methyltransferaseaktivitäten in B. subtilis und E. coli	71
3.4.	Die methylierten Basen der rRNA in B. subt.	75
3.5.	Einfluß von Pactamycin auf die Methylierung von RNA	78
3.5.1.	Methylierung spezifischer Basen der tRNA in B. subtilis während der Pactamycinbehandlung	84
3.5.2.	Remethylierung der isolierten tRNA	88
3.5.3.	Übersicht über Resultate der tRNA-Basen- analysen aus Pactamycin behandelten B. subt.	90
3.6.	Eigenschaften der tRNAs aus Pactamycin behandelten B. subtilis	92
3.6.1.	Chromatographisches Verhalten	92
3.6.2.	Acylierbarkeit	96
4.	Diskussion	98
4.1.	Basenanalyse	98
4.2.	Vergleich der Muster der methylierten Basen in E. coli und B. subtilis	99
4.3.	Charakterisierung untermethylierter RNA aus Pactamycin behandelten B. subtilis	103
4.4.	Acylierbarkeit untermethylierter tRNA	109
5.	Zusammenfassung	111
	Literaturverzeichnis	114

1. Einleitung.

Lebende Zellen sind zu einer Fülle von Stoffwechselleistungen befähigt, die durch die Gesamtheit spezifischer Enzyme bestimmt und reguliert werden. Die komplexe Maschinerie der Synthese eines Enzyms wurde von F. CRICK (1958) als "zentrales Dogma der Molekularbiologie" folgendermaßen formuliert:



Dieses Schema beschreibt den Informationsfluß von der DNA zum Protein vermittelt der RNA. Die Umschreibung der DNA in RNA-Sequenzen wird als Transkription, die Übersetzung der RNA in Proteinmoleküle als Translation bezeichnet.

Die Fähigkeit eines Organismus die Information identisch an seine Nachkommen weiterzugeben, beruht auf dem Vorgang der DNA-Replikation. Unter Replikation versteht man die enzymatisch katalysierte Verdopplung eines DNA-Stranges, wobei die vorhandene DNA als Matriz für die neu entstehende dient.

Alle RNAs entstehen durch Basenpaarung an bestimmten Abschnitten der DNA, indem sich Ribonucleotide spezifisch durch Wasserstoffbrückenbindungen an einen DNA-Strang anlagern und untereinander durch ein Enzym kovalent verbunden werden (Transkription). So entstehen durch aufeinanderfolgende Addition von Nucleotiden neue Sequenzen, die dem Ausgangsstrang komplementär sind. Die entstehenden Ribonucleinsäuren lassen sich in drei Klassen einteilen:

a) die messenger- oder Boten-RNA, die die DNA-Information als Drucksatz zu den Ribosomen liefert, um sie dort in Proteinmolekülen auszudrucken. Die mRNA ist frei beweglich

und assoziiert mit einem Ribosom, dem es dadurch vorübergehend die Spezifität der Geninformation aufprägt.

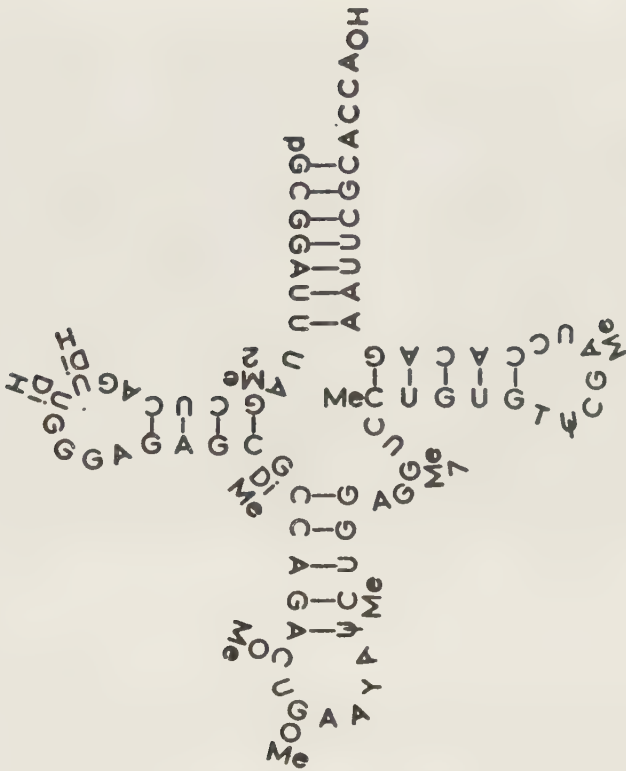
b) die unspezifischen, ribosomalen RNA-Fraktionen, die mit Proteinen gemeinsam die Bausteine der Ribosomen darstellen. Das Ribosom selbst besteht aus zwei Untereinheiten, die wiederum zu je $1/3$ aus Protein und zu $2/3$ aus ribosomaler RNA bestehen. Aus der kleinen Untereinheit (30 S) läßt sich eine rRNA isolieren, die bei 16 S sedimentiert. Aus der größeren Untereinheit (50 S) lassen sich zwei rRNA-Arten isolieren, die bei 23 S und 5 S sedimentieren. Die 5 S rRNA aus *Escherichia coli* Ribosomen ist in ihrer Basensequenz aufgeklärt und besitzt Einzel- und Doppelstrangbereiche (LEWIS, 1970). Die beiden großen rRNAs werden derzeit in ihrer Sequenz erforscht (FELLNER et al., 1970, 1973).

c) die lösliche oder tRNA (ca. 20% der gesamten RNA), die eine heterogene Fraktion von Molekülen umfaßt, die in der Ultrazentrifuge ungefähr bei 4 S sedimentiert. Das Molekulargewicht beträgt ca. 25 000 - 30 000 Dalton, was 75 - 85 Nucleotiden entspricht (SÖLL, 1971). Bisherige Modellvorstellungen der Sekundär- und Tertiärstruktur zeigen die Abbildungen 1 und 2.

Die relativ kleinen Moleküle sind in der Zelle an keine Strukturen gebunden, sondern sind im Cytoplasma freigelöst. In *E. coli* gibt es ca. 60 verschiedene tRNA-Moleküle (LENGYEL und SÖLL, 1969).

Jede tRNA kann an einem Ende enzymatisch mit einer spezifischen Aminosäure verestert werden und besitzt eine Affinität zu bestimmten Sequenzen der mRNA.

Bei der Übersetzung der informationshaltigen Nucleotidsequenzen in die Aminosäuresequenzen der Proteine hat die tRNA die Aufgabe, die molekulare Verbindung zwischen den Informationstemplates (Codons) der mRNA und den aktivierten Aminosäuren herzustellen.



Phenylalanine tRNA

Abbildung 1: Struktur der Phenylalanin-tRNA von Hefe, angeordnet in dem konventionellen Kleeblatt-Modell.

Die Sequenz wurde von RHAJBHANDARY et al. (1968) analysiert.

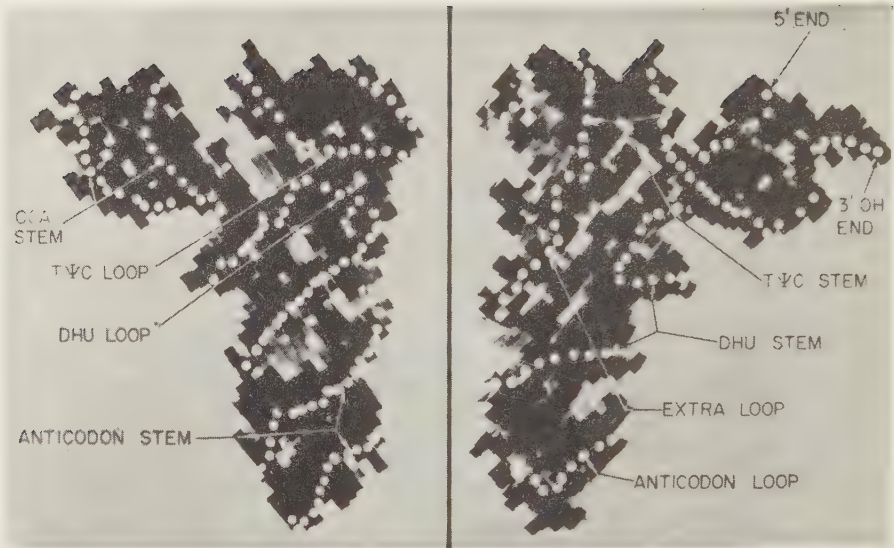


Abbildung 2: Zweiseitige Ansicht eines dreidimensionalen Molekülmodells der Phenylalanin-tRNA von Hefe.

Die Aufnahmen wurden von A. RICH et al. (1973), nach Röntgenstrukturanalysen mit einer Auflösung von 4 Å, veröffentlicht. Die weißen Punkte symbolisieren die Polynucleotidkette der tRNA. Die dunklen Scheiben charakterisieren die Elektronendichte.

Der Translationsvorgang geschieht in der Zelle am Ribosom. Die Polypeptidkette wächst somit am Ribosom-mRNA-Komplex unter Beteiligung aller Arten von RNA-Molekülen.

Unter verschiedenen physiologischen Bedingungen unterliegt der Metabolismus einer Zelle großen Veränderungen. Die Regulation des Stoffwechsels auf der Transcriptionsebene ist wissenschaftlich gesichert und gut verstanden (JACOB und MONOD, 1961). Regulationsmechanismen auf der Ebene der Translation werden gegenwärtig intensiv erforscht. Veränderungen der vielen Komponenten, die an der Translation beteiligt sind (z.B. Faktoren, Ribosomen, tRNAs), könnten die Geschwindigkeit oder das Ausmaß der Proteinsynthese beeinflussen. Die zentrale Stellung der tRNAs im Proteinsynthesystem, die Vielfalt dieser Moleküle und die Vielfalt ihrer Funktionen, läßt Regulationsaufgaben dieser Zellinhaltsstoffe denkbar erscheinen.

Zur Aufklärung zellulärer Prozesse und ihrer Regulation werden in der Molekularbiologie erfolgreich Antibiotika eingesetzt.

Antibiotika sind Substanzen, die hemmend in den Stoffwechsel von Organismen eingreifen. Sie sind Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen, die als Bakteriostatika eine Vermehrung von Bakterien verhindern, oder als Bakterizide zur Abtötung bestimmter Erreger führen. In der Biochemie werden diese Substanzen, neben der Aufklärung ihrer Wirkungsmechanismen, als Hilfsmittel zur Erkenntnis von Mechanismen des Zellstoffwechsels, insbesondere der Replikation, Transkription und Translation verwendet.

Die in der vorgelegten Arbeit besprochenen Resultate zeigen, wie Antibiotika hilfreich zur Erforschung der Modifikation von insbesondere tRNAs benutzt werden können.

Die tRNAs unterscheiden sich von den übrigen RNA-Arten deutlich in ihrer Basenzusammensetzung. Sie werden zwar auch an bestimmten DNA-Abschnitten synthetisiert und bestehen also aus den vier Hauptbasen Adenin, Guanin, Cytosin und Uracil. Darüberhinaus werden diese tRNAs aber nach Fertigstellung ihrer Primärstruktur durch bestimmte Enzyme spezifisch modifiziert, was zu ca. 30 bisher bekannten, seltenen Nucleosiden führt. Die meisten seltenen Nucleoside leiten sich von Adenosin, Guanosin, Uridin und Cytidin durch enzymatisch katalysierte Methylierung an C, O oder N ab (MANDEL und BOREK, 1961).

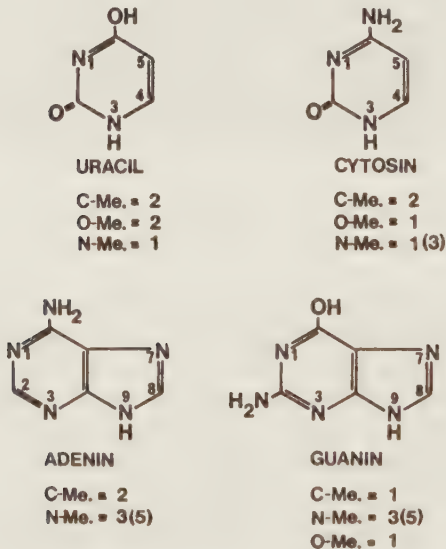


Abbildung 3: Darstellung der vier Hauptbasen und Be-
zifferung der theoretisch möglichen Methylierungen an
C, N oder O.

Die in den Klammern angegebenen Zahlen berücksichtigen
die Möglichkeit der Doppelmethylierung der ringständigen
Aminogruppen.

Dabei wird entweder die Base oder die Ribose methyliert. Außer Monoderivaten werden auch Dimethylderivate gefunden. Hervorgehoben sei, daß zwei Modifikationen, nämlich 5-Ribosyluracil oder Pseudouridin und Ribothymidin, ein durch Modifikation im Makromolekül entstandenes Thymin, in fast allen bisher untersuchten tRNAs vorkommen.

Tierische tRNAs enthalten einen höheren Anteil seltener Nucleoside als Hefe-tRNAs, die wiederum stärker modifiziert sind als tRNAs aus Bakterien. Aber auch die tRNAs sehr niederer Organismen, die T 4-Phagen induzierte tRNA enthält noch Pseudouridin (ZACHAU, 1968).

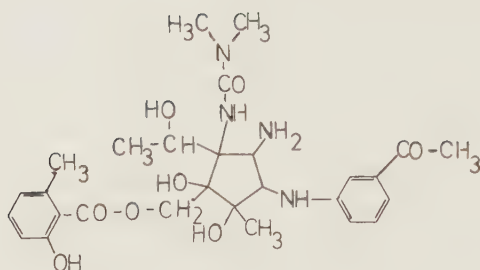
Es fällt schwer, anzunehmen, daß die in der Evolution immer weiter verfeinerte Modifizierung der tRNA nur eine "Laune der Natur" sei. So bleibt die Suche nach den Funktionen der seltenen Nucleotide ein interessantes Problem der Nucleinsäure-Biochemie.

Antibiotika, die in die Methylierung von Transferribonucleinsäuren eingreifen, könnten dazu dienen, Aufschluß über die Funktion der methylierten Basen in den tRNAs zu gewinnen.

In dieser Arbeit wurde Pactamycin verwendet, ein Antibiotikum, das therapeutisch nicht eingesetzt werden kann, aber Bedeutung in der molekularen Biologie besitzt, da es Schritte des Stoffwechsels spezifisch hemmt.

Pactamycin ist ein Hemmstoff der Proteinbiosynthese, sowohl in lebenden Bakterien als auch in zellfreien Extrakten von Pro- und Eucaryoten (YOUNG, 1966; COLOMBO et al., 1966; BHUYAN, 1967).

Die komplette chemische Struktur von Pactamycin wurde von WILEY et al., 1970 veröffentlicht (siehe Abb. 4).



PACTAMYCIN

Abbildung 4: Die Strukturformel von Pactamycin, einem Cyclopentanderivat.

Der Angriffspunkt und Mechanismus der Wirkung von Pactamycin wurde von mehreren Autoren untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß die Initiation der Proteinsynthese durch Wechselwirkung des Antibiotikums mit dem Initiator-komplex, bestehend aus mRNA, der 30 S Ribosomenunter-einheit, Formylmethionyl tRNA und dem Initiationsfaktor F_3 , gehemmt wird. Es verändert die Struktur dieses Komplexes und bewirkt seine Destabilisierung und Dis-soziation (COHEN et al., 1969 a,b; LODISH et al., 1971). In höheren Konzentrationen läßt sich auch eine Hemmung der Elongation zeigen (TAI et al., 1973). Alle Unter-suchungen zur Klärung des Wirkungsmechanismus von Pacta-mycin wurden in zellfreien Systemen durchgeführt.

Zur Wirkungsweise von Pactamycin beschrieben H. KERSTEN et al., (1967) Versuche, die mit Organellen aus mit Anti-biotikum behandelten *B. subtilis* Keimen durchgeführt worden waren. Auch in diesen Experimenten zeigte sich eine Beeinflussung der Proteinsynthese auf ribosomaler Ebene.

Durch geeignete radioaktive Einbauversuche ließ sich ähnlich wie bei anderen Hemmstoffen (z.B. Tetracyclinen, Puromycin, Erythromycin oder Chloramphenicol) auch bei Pactamycineinwirkung zeigen, daß bei starker Proteinsynthesehemmung die RNA-Synthese unbeeinflusst weitergeht, in bestimmten Konzentrationen sogar stark stimuliert wird. So kann man durch Trennung der RNA-Arten aus behandelten Zellen eine Anhäufung der tRNA auf das dreifache, der ribosomalen RNA auf das doppelte der Kontrolle nachweisen. Ähnlich starke Stimulierung der RNA-Synthese kann auch in der Leber behandelter Ratten festgestellt werden. (M. FEY, persönliche Mitteilung)

Nach Beobachtungen von BOREK et al. (1963), wird in der für Methionin auxotrophen *E. coli* Mutante K 12 W 6 bei Aminosäuremangel RNA vermehrt synthetisiert. Dieser RNA fehlen Methylgruppen. Ob das Fehlen von Methylgruppen in den tRNAs nur auf den Mangel an Methionin zurückzuführen ist, oder ob auch als Folge einer vermehrten RNA Produktion untermethylierte RNAs entstehen, wurde unter Verwendung von Pactamycin an *B. subtilis* untersucht (H. KERSTEN et al., 1968). Die aus behandelten Keimen isolierte rRNA nahm bei der Remethylierung durch einen homologen Enzymextrakt doppelt soviel, die tRNA viermal soviel Methylgruppen auf wie die aus unbehandelten Kontrollkeimen.

Die Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit gemacht wurden, wollten primär weder die Wirkungsweise von Pactamycin noch den Mechanismus, der zur Untermethylierung von RNA führt untersuchen, sondern in erster Linie den Effekt der Untermethylierung charakterisieren, um ihn in der zentralen Frage nach der Funktion der Methylgruppen in tRNAs experimentell sinnvoll verwenden zu können.

Folgende Fragen sollen untersucht werden:

- 1) Wie groß ist die Untermethylierung der einzelnen RNA-Fractionen in Keimen, die unter Pactamycineinfluß gewachsen sind.
- 2) Welche Basenmethylierungen der tRNAs von *B. subtilis* sind nach Pactamycineinwirkung vermindert.
- 3) Betrifft die Hypomethylierung alle spezifischen tRNAs, oder sind nur bestimmte Moleküle betroffen.
- 4) Lassen sich untermethylierte tRNAs ebenso gut mit der spezifischen Aminosäure acylieren wie normal modifizierte Kontroll tRNAs.

Zur Lösung der Probleme wurde als Untersuchungsobjekt *Bacillus subtilis*, ein grampositiver, sporenbildender Keim gewählt, weil er im Gegensatz zu *Escherichia coli* Pactamycin gut in die Zelle aufnimmt. Durch relativ niedrige Konzentrationen des Antibiotikums können deutliche Effekte erzielt werden.

Da die methylierten Basen in *B. subtilis* bisher nicht bekannt sind, muß Anzahl und Menge erst bestimmt werden, um über Veränderungen nach Art und Zahl urteilen zu können.

Die erarbeitete Analysenmethode beruht auf der zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie nach vorheriger Hydrolyse radioaktiv markierter tRNA. Die Methode wird unter Ergebnissen genau beschrieben.

Da die methylierten Basen, die in der tRNA von *E. coli* vorkommen, weitgehend bekannt sind, bietet sich als Vergleich und experimentelle Kontrolle an, das Muster der methylierten Basen von *E. coli* und *B. subtilis* gegenüberzustellen. Unterschiede, die sich ergeben, könnten eventuell Aufschlüsse über Funktionen der

Modifizierung erbringen.

Der Proteinsynthesehemmstoff Pactamycin bietet sich an, untermethylierte tRNA in Bakterien zu erhalten. Ob dies als experimentelles "Werkzeug" bei der Frage nach der Funktion der Methyltransferasen dienen kann, soll durch die Charakterisierung dieses Effektes in dieser Arbeit geklärt werden.

2. Material und Methoden:

2.1. Material und Geräte:

Die Chemikalien wurden von folgenden Quellen bezogen: Die methylierten Nucleoside wurden bei Cyclo-Chemical-Corp., Los Angeles, California, USA, erworben. Um authentische Referenzen für die Basenanalyse zu erhalten, wurden die käuflichen Nucleoside mit 70%iger HClO_4 zu Basen hydrolysiert. Die überschüssige Säure wurde durch Neutralisation mit Kaliumbicarbonat als KClO_4 in der Kälte ausgefällt. Alle Dünnschicht-Chromatographien wurden auf Celluloseplatten der Firma Merck 20 x 20 cm ohne Fluoreszenzindikator durchgeführt.

DEAE-Sephadex A-50 wurde von der Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden, gekauft. DEAE-Cellulose (DE 32) wurde von der Firma Whatmann bezogen. BD-Cellulose war ein Produkt von Boehringer, Mannheim, Résines Voltaef 300 LD-PL micro, ein Erzeugnis der Uguine Kuhlmann, Frankreich, erhielten wir bei Lehmann und Voss, Hamburg. Adogen 464 wurde bei Ashland Chemical Co., Columbus, Ohio, USA, gekauft.

Alle benützten Chemikalien und Lösungsmittel waren "pro analysi" Erzeugnisse der Fa. E. Merck AG., Darmstadt.

Radioaktive Substanzen wurden von The Radiochemical Centre, Amersham, erworben. Die spezifische Radioaktivität wird jeweils im Text angegeben. Die Autoradiographien der Dünnschicht-Chromatogramme wurden mit Röntgenfilmen der Fa. Agfa (Osray T_4 24 x 30) oder der Fa. Dupont (Doneo medical X-Ray 24 x 30) erhalten.

Die UV-Absorption des Eluates der Säulenchromatographien wurde mit einem Uvicord I oder II der Fa. LKB Produkter AB, Bromma, Schweden, bei 254 nm gemessen und mit einem Schreiber der gleichen Firma automatisch registriert.

Fraktioniert wurde im Fraktionssammler der gleichen Firma (Ultrorac) in einer Colora Kühltruhe. Alle benutzten Pumpen waren Perpex-Pumpen von LKB. Die optische Dichte wurde im PMQ II UV-Spektrophotometer der Fa. Zeiss oder bei kontinuierlichen Spektren in einem Gilford-Spektrometer, Modell 2400, gemessen.

Die Radioaktivität wurde in Flüssigkeitsszintillationszählern der Firma Packard (Modelle 3320 und 3375) bestimmt. Von der gleichen Firma wurden die Szintillatoren FPO und Dimethyl-POPOP bezogen.

Das Antibiotikum Pactamycin ist ein Geschenk der Fa. Upjohn Company, Kalamazoo, Michigan, USA und wurde ohne weitere Reinigung verwendet.

2.2. Züchtung und Wachstum der Bakterien:

Verwendet werden *Bacillus subtilis* W 23, *Escherichia coli* MRE 600, *Escherichia coli* meth⁻ rel⁻ und *Bacillus subtilis* meth⁻ rel⁺. Zur Züchtung des *B. subtilis* Wildtyps (*Heubacillus*) wurde ein Minimalmedium (OGILVIE 1970) verwendet.

Für die Methioninmangelmutante wurde dasselbe Medium mit 5 - 10 µg l-Methionin pro ml Medium ergänzt.

Escherichia coli MRE 600 wurde in einem Glucose-Minimalmedium gezüchtet, das bei KERSTEN et al. (1965) beschrieben ist. *E. coli* meth⁻ wuchs in dem Medium von FLEISSNER und BOREK (1962).

Alle Bakterien, bei denen keine radioaktive Markierung von Nucleinsäuren durchgeführt wurde, wurden in einem 20 l Fermenter der Fa. Eschweiler, Kiel, gezüchtet. Die Ernte geschah mit einer Ceba-Durchlaufzentrifuge.

Sollten die Keime mit Antibiotikum (Pactamycin) behandelt werden, so wurde bei einer $OD_{578} = 0,7$, $d = 1$ cm, 0,25 µg Pactamycin pro ml Medium zugegeben. Nach 3 Stunden Einwirkung wurden die Zellen geerntet. Das Wachstum der Keime bei der Ernte wird durch rasches Abkühlen der Kultur auf 0° - 4° C unterbrochen. Die Aktivitäten sämtlicher Enzyme, einschließlich der abbauenden RNAsen, sind bei dieser Temperatur beträchtlich herabgesetzt.

2.3. Aufschluß der Bakterien und Gewinnung der Gesamtnucleinsäuren.

Alle Arbeiten werden bei 0° - 4° C durchgeführt. 5 g Bakterienfeuchtgewicht werden mit 15 g Aluminiumoxid (Alcoa A-305) und einem Tropfen puffergesättigtem Phenol in einem vorgekühlten Mörser so lange stark verrieben, bis eine pastenartige Masse entsteht. Diese wird in kleinen Portionen mit insgesamt 10 ml eines Puffers (0,01 m Tris-HCl, pH = 7,4; 0,01 m $MgAz_2$ und 0,001 m 2-Mercaptoäthanol, (AVITAL und ELSON 1969) möglichst quantitativ in ein Zentrifugenglas gespült. Alcoa, Zellwände und nicht aufgeschlossene Zellen werden 20 Min. bei 15 000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wird 30 Min. mit dem gleichen Volumen puffergesättigten Phenol gerührt. Zur Phasentrennung wird 30 Min. bei 30 000 x g zentrifugiert. Die wässrige Phase, die sich über dem Phenol und einer Proteinzwischenschicht ansammelt, wird mehrmals mit Äther ausgeschüttelt, um das Phenol quantitativ zu entfernen. Der Äther wird schließlich mit Stickstoff verblasen. Die hierbei erhaltene Lösung kann nun direkt zur Säulenchromatographie verwendet werden.

Phenolfreie Nucleinsäurepräparationen lassen sich auch durch Ausfällen mit dem 2,5 fachen Volumen Äthanol/2% Kaliumacetat bei -20° C über mindestens 4 Stunden erreichen, wenn der Niederschlag mehrmals mit Äthanol nachgewaschen wird. Nach vollständigem Trocknen bei Raumtemperatur kann der Nucleinsäureniederschlag in dem benötigten Puffer aufgelöst werden.

2.4. Präparation der Gesamt-tRNA.

Für die Präparation von biologisch aktiver tRNA aus *B. subtilis* erwies sich die Säulenchromatographie über DEAE-Sephadex A-50 als die beste Methode.

Angewendet wurden die Bedingungen, die bei NISHIMURA und WEINSTEIN (1969) beschrieben sind.

Für einen Extrakt aus 20 g Bakterien gilt folgende Vorschrift: Eine Säule von 1 cm Durchmesser und 80 cm Länge wird mit vorgewaschenem DEAE-Sephadex A-50 (NISHIMURA 1971) gefüllt. Bei einer Durchflußrate von 10 ml pro Stunde wird mit einem Gradientenvolumen von 750 ml, bestehend aus gleichen Teilen Puffer A und Puffer B (linearer NaCl-Gradient) chromatographiert, wobei Fraktionen von 4 - 6 ml gesammelt werden.

Puffer A: 0,01 m MgAc_2 ; 0,02 m Tris-HCl pH = 7,5
(Standardpuffer) und 0,375 m NaCl.

Puffer B: Standardpuffer + 0,525 m NaCl.

Die Chromatographie unter diesen Bedingungen ermöglicht die Präparation der 4 S RNA bei weitgehender Abtrennung der 5 S RNA. (Siehe Abb. 5)

Zur Wiedergewinnung der tRNAs aus dem Säuleneluat werden die 4 S RNA-Fraktionen vereinigt und am Rotationsverdampfer bei ca. 15 Torr und Zimmertemperatur bis zur Salzsättigung eingeengt. Die Lösung wird dann gegen Aqua bidest. dialysiert, bis der Salzgehalt der Lösung vernachlässigbar klein ist. Nach nochmaligem Einengen am Rotationsverdampfer kann die tRNA aus der Lösung mit 2,5 fachem Volumen Athanol/2% Kaliumacetat ausgefällt werden. Die biologische Aktivität wird durch diese Aufarbeitung nicht vermindert.

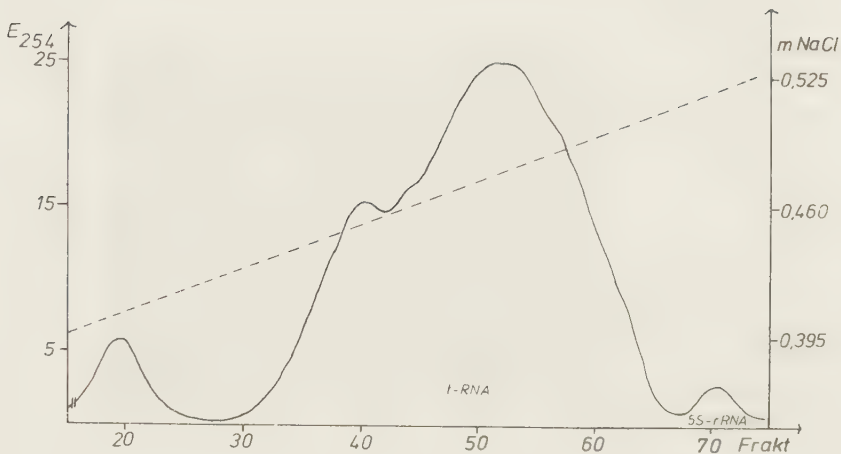


Abbildung 5: Chromatographie eines Nucleinsäureextraktes aus *B. subtilis* an DEAE-Sephadex A-50.

2 500 OD₂₆₀ eines Nucleinsäureextraktes wurden auf eine 1 x 80 cm Säule gegeben und mit 750 ml eines linearen Gradienten von 0,375 m NaCl - 0,525 m NaCl in Puffer eluiert. Der Elutionspuffer ist in Material und Methoden beschrieben. Bei einer Durchflußrate von 9,6 ml/h wurden Fraktionen von 4,8 ml gesammelt.

——— OD₂₅₄
 ----- m NaCl

Zur Kontrolle der Reinheit der RNA-Präparation wird das Absorptionsspektrum aufgenommen (210 - 300 nm; Gerät: Beckmann DK 2).

Bei reinen Präparationen liegen die Quotienten

$$\frac{E_{260}}{E_{235}} \quad \text{und} \quad \frac{E_{260}}{E_{280}} \quad \text{bei Werten um } 2,0.$$

Zur Bestimmung der Konzentrationen der Nucleinsäuren wurde die Extinktion bei 260 nm benutzt. Es gilt annähernd folgender Wert: $1 \text{ OD}_{260} = 44 \mu\text{g tRNA}$. Als weitere analytische Reinheitsprüfung wurden die tRNA-Präparationen in einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese untersucht.

Die Stäbchengel-Elektrophoresen wurden mit freundlicher Unterstützung von Dr. H. J. Aschoff durchgeführt. (Siehe Abbildung 6).

Die Untersuchung der Acceptorfunktion als funktioneller Test einer tRNA-Präparation geschieht wie unter 2.6. beschrieben. Eine typische Acylierungskinetik zeigt Abbildung 7.

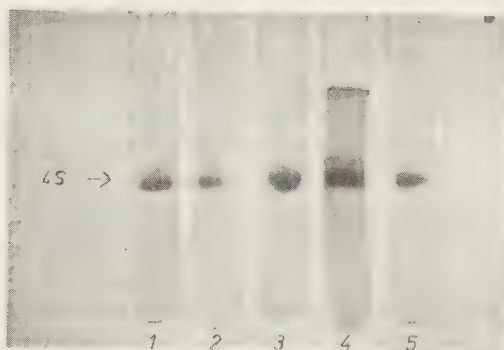


Abbildung 6: Gelelektrophoresen der tRNAs von *E. coli* oder *B. subtilis*, die unter Verwendung von DEAE-Sephadex A-50-Säulen präpariert wurden.

Die Gele bestehen aus 7 cm 10%igem Polyacrylamid-Trenngel und 4 cm Sammelgel (2,5% Polyacrylamid und 0,5% Agarose). Der Trenngelpuffer ist 0,05 m Tris-HCl, pH = 8,9; der Sammelgelpuffer 0,05 m Tris-HCl, pH = 7,8. tRNA, 0,5 OD₂₆₀ pro Gelstäbchen, werden bei maximal 2 mA über eine Laufstrecke von 5,5 cm im Trenngel elektrophoretisiert. Die RNA-Banden sind mit Methyleneblau angefärbt.

1 = tRNA aus *E. coli* (Boehringer); 2 = tRNA aus *B. subt. meth.*; 3 und 4 = tRNA aus *B. subtilis* W 23; 5 = tRNA aus *B. subtilis* nach Pactamycineinwirkung.

2.5. Präparation von Enzymextrakten (S-100) aus Bakterien.

Der Aufschluß der Bakterien geschieht wie unter 2.3. beschrieben. Der Suspensionspuffer ist in diesem Fall 0,01 m Tris-HCl, pH = 7,8; 0,006 m 2-Mercaptoäthanol; 0,006 m KCl und 0,01 m MgAc_2 (NIRENBERG und MATTHAEI, 1961). Nach niedertourigem Abzentrifugieren von Zelltrümmern und Alcoa wird der Überstand 2 Stunden bei 100 000 x g zentrifugiert. Die oberen zwei Drittel des Überstandes werden als Enzymextrakt in kleinen Portionen bei -40°C eingefroren. Sollte der Enzymextrakt zur Aminoacylierung von tRNA benutzt werden, so wurde der S-100 Überstand zur Entfernung endogener tRNA über DEAE-Cellulose chromatographiert.

Der Proteingehalt wird mit der Mikrobiuretmethode (BAOLEY, 1967) in Doppelansätzen bestimmt.

2.6. Aminoacylierung der tRNA.

Der Reaktionsansatz zur Beladung der tRNA mit Phenylalanin ist bei FELDMANN und FALTER (1971) beschrieben. Für *Bacillus subtilis* tRNA enthält der Ansatz folgende Bestandteile:

12,5 μMol Tris-HCl pH = 7,5
 0,75 μMol MgAc_2
 0,75 μMol NH_4Cl
 0,5 μMol ATP
 30,0 μg Protein aus dem Enzymextrakt
 2,25 nMol ^{14}C -Phe (51 mCi/nMol)
 1,8 nMol tRNA (= 1 OD₂₆₀)

Das Gesamtvolumen des Ansatzes beträgt pro OD₂₆₀ Gesamt-tRNA 0,1 ml.

Die Reaktion wird 15 Min. bei 37°C durchgeführt und

dann durch Phenolzugabe (0,1 ml) bei 0° C beendet. Kinetische Untersuchungen der Acceptoraktivität wurden mit der Filterplättchenmethode nach MANS und NOVELLI (1961) durchgeführt.

2.6.1. Präparative Aminoacylierung.

Der Reaktionsansatz wird bei präparativer Aminoacylierung auf die Substratmenge umgerechnet und ebenso inkubiert wie bei analytischer Verwendung. Zur Wiedergewinnung der tRNA aus dem Reaktionsgemisch gibt es zwei Verfahren:

a) Der Ansatz wird mit dem gleichen Volumen gesättigten Phenols 30 Min. bei 4° C gerührt. Die Phasen werden durch Zentrifugieren getrennt. Aus dem wässrigen Überstand wird die tRNA mit Äthanol/Kaliumacetat bei -20° C mindestens 4 Stunden lang gefällt.

b) Die säulenchromatographische Reinigung der tRNA nach YANG und NOVELLI (1968) .

Das Reaktionsgemisch wird mit demselben Volumen 0,25 m NaCl, 0,01 m $MgAc_2$ und 0,001 m EDTA, pH = 4,8 , verdünnt und auf eine kleine DEAE-Cellulose-Säule (Whatman DE 32,1 x 3 cm) gegeben, die vorher mit diesem Auftragspuffer aequilibriert wurde. Die Säule wird mit mindestens 50 ml desselben Puffers gewaschen. Die tRNA kann anschließend mit ca. 5 ml 1 m NaCl, 0,01 m $MgAc_2$ und 0,001 m EDTA, pH = 4,8, eluiert werden.

Soll die Acceptoraktivität in den Fraktionen eines Säuleneluats gemessen werden, so wird ein Aliquot jeder Fraktion in dem oben beschriebenen Reaktionsansatz inkubiert und die säurefällbare Radioaktivität nach Beendigung der Reaktion auf Papierfiltern gemessen.

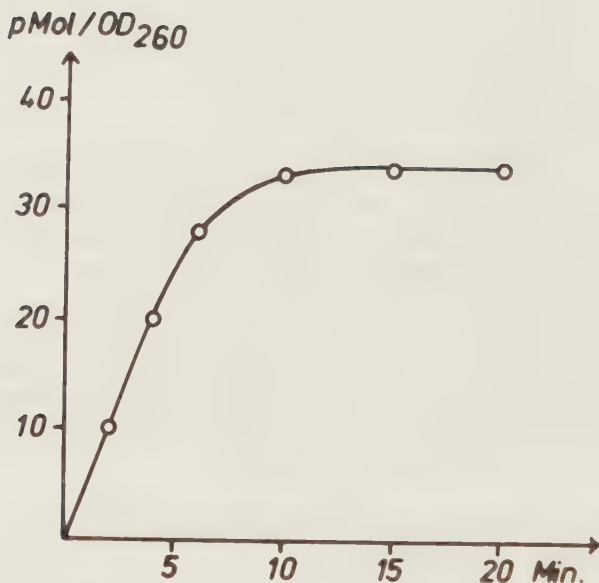


Abbildung 7: Kinetik der Acylierung von Gesamt-tRNA mit ^{14}C -Phenylalanin.

Die Reaktionsbedingungen sind unter 2.6. in Material und Methoden angegeben. Das Gesamtvolumen des Ansatzes beträgt 0,4 ml bei 4 OD₂₆₀ tRNA. Zu den angegebenen Zeiten werden während der Inkubation bei 30° C 50 µl entnommen, auf Whatmann 3 MM Filter pipettiert, 20 sec im heißen Luftstrom getrocknet und in 10%ige Trichlor-essigsäure (TCA) bei 0° C gegeben. Nach mindestens zehnmütigem Stehen wird zweimal mit 5% iger TCA, einmal mit Äthanol und einmal mit Äther gewaschen. (je Filter 10 ml Waschflüssigkeit und 10 Min. waschen). Die getrockneten Filter werden in Probegläser mit 12 ml Toluolszintillator gegeben und die Radioaktivität gemessen.

2.7. Methylierung isolierter tRNA.

Die Remethylierung untermethylierter tRNAs mit Enzym-extrakten *in vitro* wird nach HURWITZ (1964) durchgeführt. 20 OD₂₆₀ einer über DEAE-Sephadex gereinigten tRNA werden in einem Ansatzvolumen von 1,7 ml mit 0,2 μ Mol ¹⁴(C)-S-Adenosylmethionin (SAM = 53 μ Ci/ μ Mol); 2,5 μ Mol Tris-HCl, pH = 8,0; 50 μ Mol Triäthanolamin; 10 μ Mol Mercapto-äthanol; 5 μ Mol MgCl₂ und ca. 0,5 ml Enzym, entsprechend 8 mg Protein (S-100 Extrakt), bei 37° C 120 Min. inkubiert. Zur Rückgewinnung der tRNA aus dem Reaktionsansatz wird das unter 2.6.1.b) angegebene Verfahren benutzt.

2.7.1. Untersuchung der Aktivität von Methyltransferasen.

Wird die Aktivität von Methyltransferasen untersucht, so wird der Ansatz auf 2 OD₂₆₀ tRNA berechnet und die spezifische Radioaktivität von SAM auf 0,3 μ Ci/15nMol erniedrigt. Bei kinetischen Messungen werden zu mindestens drei Zeitpunkten 50 μ l aus dem Ansatz entnommen und auf Whatman 3 MM-Filterplättchen ($\varnothing$ 2,3 cm) pipettiert. Die enzymatische Reaktion wird mit einem heißen Föhn (30 sec) gestoppt. Das noch feuchte Plättchen wird in 10% Trichloressigsäure (TCA) bei 0° C gelegt. Zur Ausfällung der tRNA läßt man das Filter ca. 1 Stunde in eiskalter TCA (10%) und wäscht dann 3 x je 5 Min. lang in 5%iger TCA, 2 x in Äthanol/2% NaAc (0° C) und 1 x mit Äther (je 10 ml pro Plättchen). Nach jedem Waschen werden die Filter auf einem Faltenfilter vorgetrocknet. Zum Schluß wird der Äther bei ca. 60° C verdampft und die Plättchen in Probegläschen mit 12 ml Toluolszintillator gegeben und gezählt (1 l Toluol enthält 5,0 g PPO und 0,3 g POPOP). Mit dieser Filterplättchen-Methode kann auch aus einem präparativen Methylierungsansatz eine Probe gezählt werden.

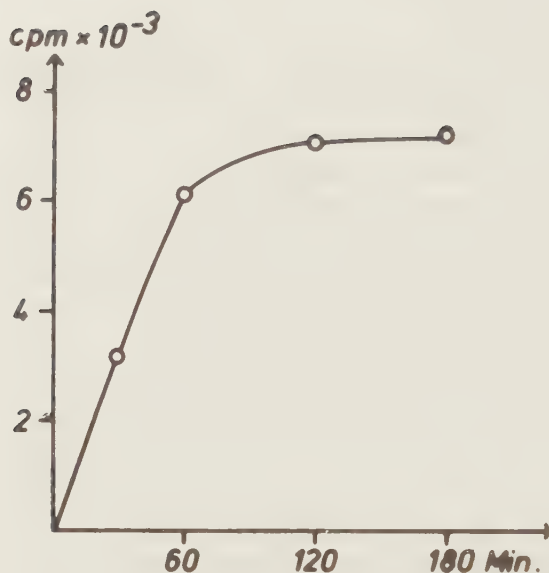


Abbildung 8: Kinetik der Methylierung von untermethylierter tRNA aus *E. coli* meth⁻ rel⁻ mit *B. subtilis* Extrakt (S-100) bei 37° C.

Die Keime wurden unter Methioninmangel nach FLEISSNER und BOREK gezüchtet. Der Reaktionsansatz (siehe Material und Methoden 2.7.) ist verdoppelt, die spez. Radioaktivität von ¹⁴(C)-S-Adenosylmethionin beträgt 0,1 μ Ci pro 15 nMol. Bei 30' 60' 120' und 180' werden je 50 μ l nach der Methode von MANS und NOVELLI auf Filterplättchen pipettiert und in Toluolszintillator gezählt.

2.8. Säulenchromatographien zur Trennung von Ribonucleinsäuren und Isolierung spezifischer und isoacceptierender tRNAs.

Die Begriffe spezifische tRNA und Isoacceptoren sind bei RAETTIG (1973) definiert. Zur Trennung wurden in dieser Arbeit ausschließlich anionische Austausch-er verwendet, die sich sowohl im Trägermaterial als auch in den fixierten kationischen Gruppen unterscheiden. Neben den Ionen - Ionen Wechselwirkungen werden bei den angegebenen Verfahren auch sekundäre Bindungskräfte wie Wasserstoffbrückenbindungen und apolare Wechselwirkungen zur Trennung ausgenützt.

2.8.1. MAK - Chromatographie.

MAK (Methyliertes Albumin auf Kieselgur), hergestellt wie bei MANDELL und HERSHEY (1960) beschrieben, erlaubt eine Trennung der Nucleinsäuren aus Bakterien in DNA, lösliche RNA (4 S und 5 S RNA) und zwei Fraktionen ribosomaler RNA (16 S und 23 S RNA).

Die genaue Beschreibung des hier verwendeten Verfahrens ist bei STEINER (1968) speziell für *B. subtilis* gegeben. Es stellt eine modifizierte Methode nach SIBATANI und MIZUNO (1963) dar. Besondere Beachtung muß der Isolierungsmethode der Nucleinsäuren aus *B. subtilis* geschenkt werden, da hier erhebliche Schwierigkeiten für die Auftrennung entstehen können.

Die bei Steiner angegebene Magnesiumionen-Konzentration muß beim Aufschluß von *B. subtilis* streng eingehalten werden, da sonst keine Trennung der ribosomalen RNS in 16 S und 23 S RNS mehr möglich ist.

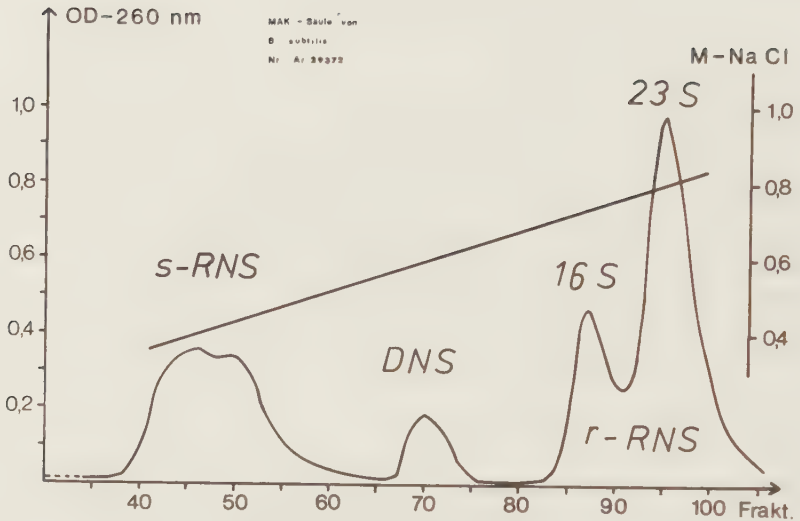


Abbildung 9: MAK-Chromatographie der Nucleinsäuren aus *B. subtilis* (Minimalmedium nach "Nakada").

40 OD₂₆₀ eines Nucleinsäureextraktes aus *B. subtilis* wurden mit 340 ml eines linearen Kochsalzgradienten (0,3 m NaCl - 1,2 m NaCl) in 0,05 m Phosphat-Puffer pH = 6,7 auf einer MAK-Säule chromatographiert (SIBATANI und MIZUNO, 1963). Die Konzentration in den Fraktionen wurde bei 260 nm gemessen.

Durchfluß : 30 ml/h

Fraktion : 3,0 ml

Temperatur : 25° C (Thermostat)

Zur Auswertung der Säulenchromatographie auf MAK werden die Extinktionen der einzelnen Fraktionen im PMQ II der Fa. Zeiss gemessen. Bei radioaktiver Markierung mit ^{14}C -Methylgruppen wird ein Aliquot jeder Fraktion in Dioxanzsintillator (BRAY 1961) gezählt.

Die gemessene Radioaktivität kann auf die Nucleinsäuremenge bezogen werden. Diese spezifische Aktivität ist ein Maß für den Methylierungsgrad der Nucleinsäuren. Entscheidende Nachteile dieser Methode sind die geringe Kapazität der MAK-Säule und der Verlust der biologischen Aktivität der tRNA, die über MAK gelaufen sind. So ist dieses Verfahren eigentlich nur von analytischer Bedeutung.

2.8.2. Chromatographie an BD-Cellulose.^{a)}

Zu den leistungsfähigsten Verfahren zur Trennung von spezifischen tRNAs gehört neben der "Reversed-Phase"-Chromatographie sicherlich die Chromatographie an BD-Cellulose. Beide Verfahren vereinen hohe Auflösungskraft, große Kapazität und viele Variationsmöglichkeiten der äußeren Parameter (Säulenlänge, Gradientenform, pH, Salzkonzentration, Temperatur etc.) und eignen sich so hervorragend zur Analyse und Präparation von iso-acceptierenden tRNAs.

Die Veresterung der freien Hydroxylgruppen der DEAE-Cellulose mit Benzoylresten (BD-Cellulose) führt zu einem neuen Trennmateriale, das sich durch dieselbe Kapazität wie DEAE-Cellulose und zusätzlich durch starke Wechselwirkungen mit hydrophoben - besonders aromatischen - Gruppierungen der tRNA auszeichnet (GILLAM et al., 1967).

a) BD-Cellulose steht für Diaethylaminoäthyl-Cellulose, die zusätzlich mit Benzoylresten verestert ist. (Benzoylated-DEAE-Cellulose)

Diese spezifische Eigenschaft der BD-Cellulose wird ausgenutzt, um tRNAs, die von Natur aus stark lipophile Substituenten tragen, von den anderen zu separieren.

Während der größte Teil der tRNA bei einer Kochsalzgradientenelution abgelöst wird, bleiben tRNAs mit hydrophoben Basen oder aromatischen Aminosäuren am Austausch haften und machen den Zusatz von Äthanol oder ähnlichen organischen Solventien zum Eluenten notwendig.

Durch N-Acylierung der mit der tRNA veresterten Aminosäure mit dem 2-Naphtoxyacetyllester des N-Hydroxy-succinimids gelang der Arbeitsgruppe TENER (GILLAM et al., 1968) die Anheftung eines aromatischen Restes, wodurch jede beliebige Gruppe von tRNA-Isoacceptoren chromatographisch anzureichern ist.

Nach Verseifung der Aminoacyllesterbindung kann dann in weiteren Schritten die Reinigung der Isoacceptoren erfolgen.

BD-Cellulose-Chromatographie wurde in dieser Arbeit durchgeführt, um das Elutionsverfahren von Phe-tRNA^{Phe} aus *B. subtilis* zu untersuchen.

Die ausführliche Darstellung der Entwicklung und die experimentellen Schwierigkeiten dieses Verfahrens kann bei RAETTIG (1973) nachgelesen werden.

Die dort angegebenen Bedingungen stellen die weiterentwickelte Original-Methode von TENER et al., (1967) sowie von ROY und SÖLL (1971) dar.

Alle säulenchromatographischen Experimente mit tRNA wurden mit radioaktiver Markierung durchgeführt. Die Gesamt-tRNA wird mit radioaktivem Phenylalanin (oder einer anderen Aminosäure) durch Aminoacyl-tRNA-synthetasen verestert (Methode ist unter 2.6.1. angegeben).

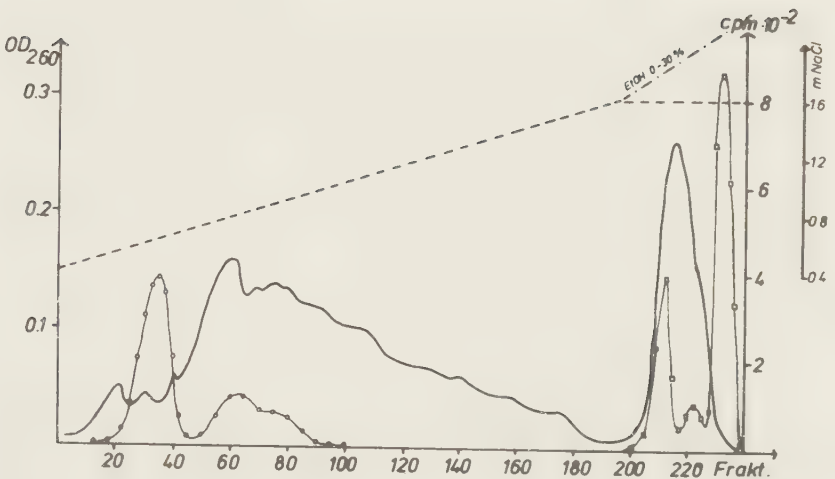


Abbildung 10: Chromatographie von tRNA aus *B. subtilis* W 23 an BD-Cellulose.

100 OD tRNA wurden mit ³H-Methionin und ¹⁴C-Phenylalanin acyliert und durch Phenolisierung und anschließende Äthanol-fällung aus dem Reaktionsansatz zurückgewonnen. Alle Puffer enthalten 0.01 m MgAc₂, 0.05 m NaAc, pH = 5.0 und 0.04% Na-azid. Eluiert wird mit 750 ml dieses Puffers mit einem linearen Kochsalzgradienten von 0.4 - 1.6 m NaCl, anschließend mit 450 ml eines Äthanolgradienten 0 - 30% in 1.6 m NaCl - Standardpuffer.

Säule : 1 x 80 cm

Temperatur: 25° C

Durchflußgeschw.: 19 ml/h

Fraktionen: 4,7 ml

——— OD₂₆₀

----- m NaCl

-.-.-% EtOH

o-o-o cpm ³H-Met-tRNA^{Met}

□-□-□ cpm ¹⁴C-Phe-tRNA^{Phe}

Bei der tRNA^{Phe} ergibt die Einführung der aromatischen Aminosäure zusätzlich hydrophobe Wechselwirkungen mit der BD-Cellulose, woraus eine verstärkte Bindung an den Austauscher resultiert. Zur Ablösung der Phe-tRNA^{Phe} wird daher zusätzlich zum Salzgradienten ein Äthanolgradient angewendet, der die Auflösung in isoacceptierende Phe-tRNA^{Phe} möglich macht. Durch die radioaktive Markierung lassen sich die mit Phe veresterten tRNAs leicht im Eluat auffinden.

Alle Pufferlösungen müssen bei der Chromatographie von acylierter tRNA auf pH = 5,0 gepuffert sein, da bei höherem pH die Esterbindung nicht stabil ist. Außerdem werden alle Pufferlösungen mit 0,04% Natriumazid versetzt, um Bakterienwachstum zu verhindern (ROY et al., 1971).

2.8.3. "Reversed-Phase"-Chromatographie.

Die Entwicklung der "Reversed-Phase"-Chromatographie (RPC) geht auf die Beobachtung von JONES (1953) zurück, daß RNAs mit einem langkettigen quartären Ammoniumsalz bei bestimmter Fremdsalzkonzentration aus wässrigen Lösungen ausgefällt werden können. Systematische Untersuchungen über den Mechanismus der Fällungsreaktion (SCOTT 1961, 1962) zeigten, daß die Trennung verschiedener RNA-Typen durch die unterschiedliche Löslichkeit des RNA-Aminkomplexes in gegebenem organischen Lösungsmittel ermöglicht wird.

Experimente von WEIL und EBEL (1962) ergaben, daß die aus organischen Phasen zurückgewonnene tRNA ihre biologische Aktivität total beibehält.

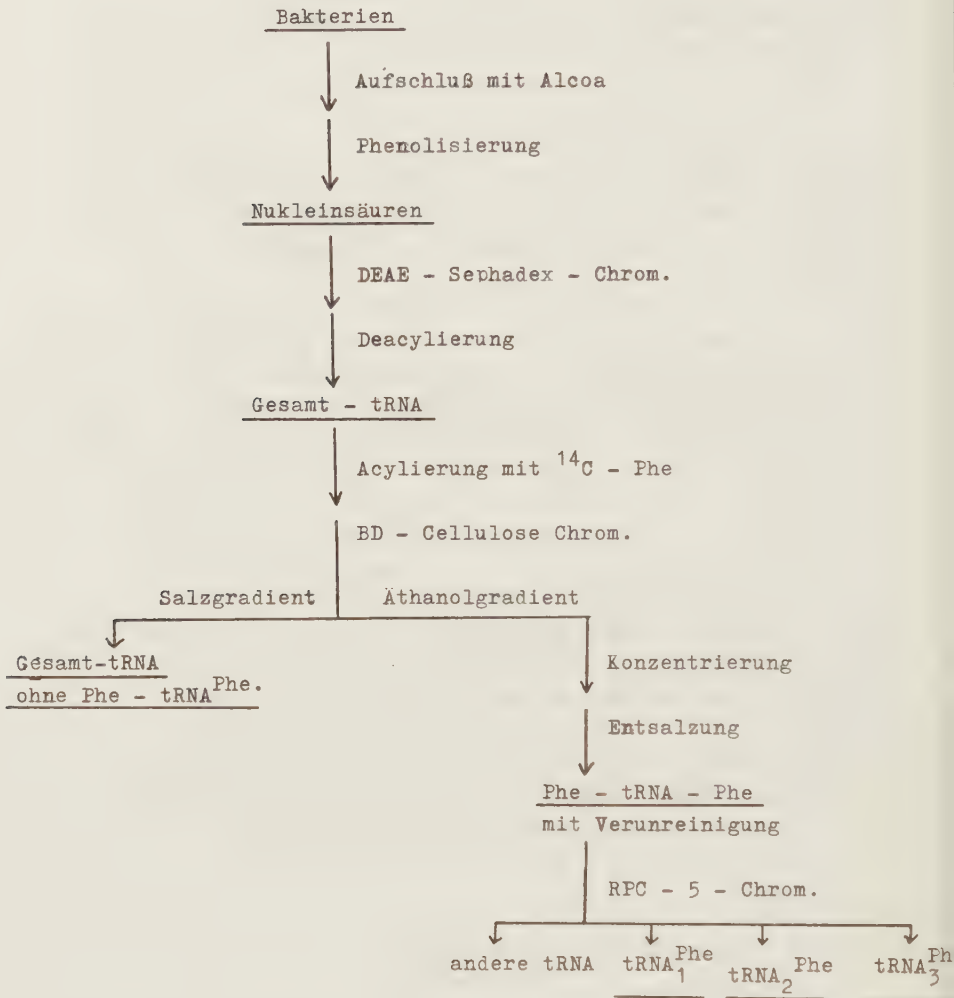
Auf diesen Erfahrungen aufbauend entwickelten KERMERS et al. (1965) das erste "Reversed-Phase"-Chromatographie System.

Es handelt sich hier um eine Verteilungschromatographie mit gleichzeitiger Ausnutzung von Ionenaustauscheffekten (MUENCH und BERG, 1966) , jedoch sind die Phasen gegenüber der normalen Verteilungschromatographie vertauscht.

Diesem RPC-1-System folgten im Laufe der Zeit fünf weitere Systeme, von denen sich die Systeme 3-6 von den ersten Verfahren dadurch unterscheiden, daß der Austauscher nicht in einem organischen Lösungsmittel gelöst wird, sondern der Träger direkt beschichtet wird.

Bei den RPC-Systemen 5 und 6 (PEARSON et al., 1971) werden als Trägermaterial Teflonharze verwandt, die absolut inert sind, während das früher verwendete silylierte Kieselgur oft noch hydrophile Gruppen besaß. Die gleichmäßige Korngröße dieser Teflonharze (Plaskon) ergibt gut gepackte Säulen mit hohem Auflösungsvermögen. Zur Analyse von isoacceptierender tRNA bieten sich RPC 5 und RPC 6 an, da sie die besten Trennungen liefern. Die geringe Teilchengröße von Plaskon CTFE 2300 ermöglicht nur sehr geringe Durchflußraten bei hohen Säulendrücken, deshalb wurde in dieser Arbeit "Résines Voltalef 300 LD-PL micro" als Trägermaterial verwendet. Durchflußraten von 80 - 90 ml pro Stunde sind hier auch bei großen Säulen leicht aufrechtzuerhalten. Als Austauscher wird Adogen 464 entsprechend der Originalmethode (PEARSON et al., 1971) auf das Trägermaterial aufgebracht.

Schema zur Isolierung von Phenylalanyl tRNA-Isoacceptoren aus
B. subtilis.



3. Ergebnisse.

In diesem Teil der Arbeit werden nur die Resultate der Experimente dargestellt. Alle sich daraus ergebenden Überlegungen und Schlußfolgerungen werden in der anschließenden Diskussion abgehandelt.

Die Ausarbeitung eines Verfahrens zur Bestimmung der Basenspezifität von Methyltransferasen wird hier beschrieben, da sie die wesentliche methodische Aufgabe des Autors darstellt.

3.1. Bestimmung der Basenspezifität.

Die Bestimmung der Basenspezifitäten der Methyltransferasen erfordert die Isolierung der Produkte der Methylierungsreaktion. Da die Methyltransferasen bisher nicht in ihre einzelnen Enzymaktivitäten getrennt werden konnten, entstehen bei der Reaktion viele methylierte Basen, die getrennt werden müssen. Mit Gesamt-tRNAs als Substraten der Methylierungsreaktion, entfallen auf die methylierten Komponenten nur 0,02 - 0,05% aller Nucleotide (NISHIMURA, 1972). Da die Analysenmethoden die Nucleinsäuremenge der Analyse nach oben limitieren, liegen die absoluten Mengen der methylierten Verbindungen bei einer Analyse im ng-Bereich. Diese geringen Substanzmengen lassen sich nur durch radioaktive Markierung finden.

3.1.1. Verschiedene Methoden.

Die Verfahren, die zur Trennung der modifizierten Komponenten der Nucleinsäuren entwickelt wurden, beruhen im wesentlichen auf papier- und säulenchromatographischen- oder elektrophoretischen Methoden. Es gibt keine Analysenmethode, die die Trennung aller modifizierten

Basen, von denen bisher mehr als 30 bekannt sind, in einem Arbeitsgang ermöglicht (HALL, 1971). Durch eine zweidimensionale Dünnschichtchromatographie kann man ungefähr 20 Komponenten in einer Probe trennen - glücklicherweise fast alle bekannten methylierten Basen. Die Analyse methylierter Basen kann in mehrere Einzelschritte unterteilt werden.

3.1.1.1. Markierung mit radioaktivem Methionin.

Die Methylgruppen der RNA werden entweder mit ^{14}C -S-Adenosylmethionin, wie in Material und Methoden unter 2.7. beschrieben, oder in den wachsenden Keimen durch ^{14}C -Methionin, das dem Nährmedium zugesetzt wird, radioaktiv markiert.

Die Basenbestimmungen nach "in vivo"-Markierungen wurden immer in 100 ml Kulturansätzen durchgeführt. Das radioaktive Methionin, mit einer spez. Radioaktivität von $100 \mu\text{Ci}/7 \mu\text{Mol}$, wurde zu Beginn der Züchtung zugesetzt. Die Bakterien wuchsen bis zu einer $\text{OD}_{578} = 1,8$ und wurden am Anfang der Ruhepause geerntet.

3.1.1.2. Hydrolysen.

Zur Basenanalyse von Nucleinsäuren bieten sich prinzipiell zwei verschiedene Hydrolyseverfahren an. Zum einen die chemische Hydrolyse, entweder sauer oder alkalisch katalysiert, zum anderen die enzymatische Hydrolyse. Beide Methoden werden in der Praxis verwendet, wobei die Auswahl von der jeweiligen Fragestellung abhängt. Hier eine kurze Beschreibung der gängigsten Verfahren.

Zur enzymatischen Hydrolyse von RNA kommen in der Hauptsache 2 Enzyme in Frage. Die Schlangengiftphosphodiesterase

spaltet die Phosphatesterbindung am 3' OH der Ribose und liefert so 5' Nucleotide. Setzt man dem Reaktionsansatz gleichzeitig bakterielle Phosphatase zu, so entstehen ausschließlich Nucleoside und anorganisches Phosphat.

Ein zweites Enzym, die T_2 -Takadiastase spaltet zu 3' Nucleotiden, also am 5' OH der Ribose, wobei die 3' Enden der RNAs immer ein Nucleosid liefern.

Vorteile der enzymatischen Methode sind die hohe Spezifität der Spaltung, die milden Bedingungen (niedrige Temperatur, kein extremer pH) und die definierte Zusammensetzung des entstehenden Hydrolysats.

Ein Nachteil ist der hohe Preis der Enzyme. Außerdem muß man das Protein aus dem Hydrolysat entfernen, um die Komponenten gut trennen zu können.

Eine Arbeitsvorschrift zur enzymatischen Darstellung von Nucleosiden aus RNA ist bei B. HACKER und MANDEL (1969) zu finden.

200 OD₂₆₀ (ca. 10 mg) tRNA werden mit 35 mg Schlangengiftphosphodiesterase und 3 mg bakterieller alkalischer Phosphatase in 2 ml Puffer pH = 8,6 (0,005 m Tris-HCl, 0,001 m MgCl₂) 18 Stunden bei 37° C inkubiert. Das Hydrolysat enthält ausschließlich Nucleoside.

Will man eine Charakterisierung der seltenen Nucleotide durchführen, läßt sich die Vorschrift von BROWNLEE (1972) verwenden.

Zwei Einheiten einer T_2 RNase werden in 1 ml 0,05 m Ammoniumazetatpuffer pH = 4,5 zusammen mit dem Substrat 2 Stunden bei 37° C inkubiert. Als Produkte entstehen ausschließlich 3' Monophosphate.

Die chemischen Hydrolysen können entweder mit starken Laugen oder mit starken Säuren durchgeführt werden.

Eine Vorschrift für die alkalische Spaltung der RNA wird von BOCK (1967) gegeben.

0,3 m KOH spaltet in 16 Stunden bei 37° C 96% aller Phosphatdiesterbindungen der RNA, wodurch man 2' oder 3' Mononucleotide erhält. Die überschüssige Kalilauge kann mit Perchlorsäure in der Kälte als KClO_4 ausgefällt werden. Die 3' Enden der RNA liefern auch hier Nucleoside.

SINGH und LANE (1964) beschrieben, daß unter alkalischen Bedingungen bestimmte Dinucleotide stabil sind. So wird z.B. das Dinucleotid $\text{m}^6\text{A} - \text{m}^6\text{A}$ ($\text{m}^6\text{A} = \text{m}^6$ -Adenosinmonophosphat) nicht hydrolysiert. Alle am 2'-Sauerstoff der Ribose methylierten Nucleoside sind alkaliresistent, was, wenn man den Spaltungsmechanismus betrachtet, einleuchtet, da das 2' OH der Ribose zur Ausbildung eines intermediären Phosphortriesters nicht mehr zur Verfügung steht. (Ähnlich wie in DNA).

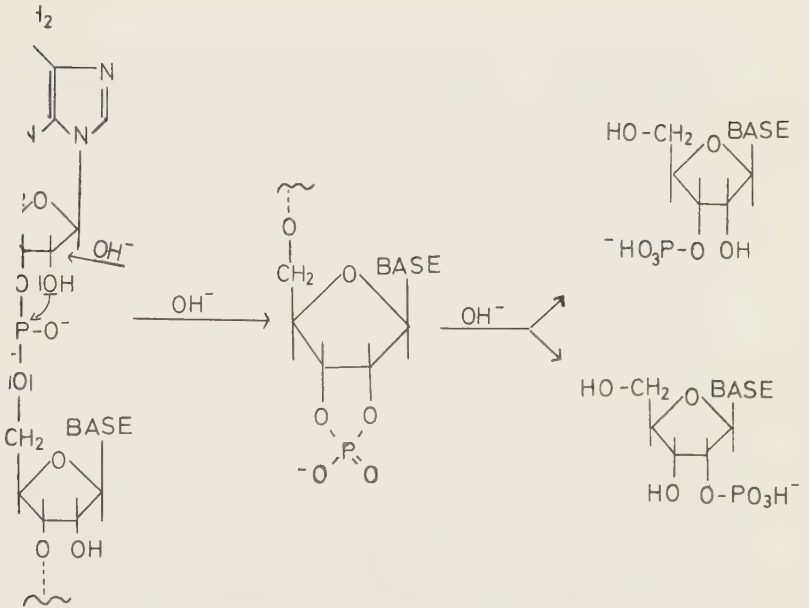
- Siehe Gleichung 1 -

Es ist weiterhin zu beachten, daß im alkalischen Milieu 1-Methyladenosin und 7-Methylguanosin chemisch verändert werden und nicht mehr als diese Substanzen aufzufinden sind. (DUNN 1963, DUNN und FLACK 1967).

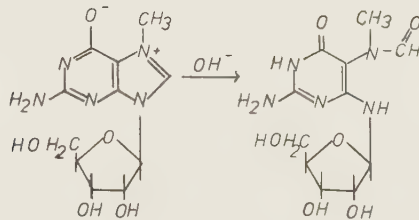
- Siehe Gleichungen 2 und 3 -

Saure Hydrolysen können nach BJORK und SVENSON (1967) mit 1 n HCl erreicht werden. Hierbei werden die Esterbindungen und ein Teil der glykosidischen Verknüpfungen gesprengt. Da die N-glykosidische Bindung von Pyrimidin-nucleosiden stabiler ist als die von Purinnucleosiden, entstehen bei einer 30 minütigen Hydrolyse bei 100° C Pyrimidin-Nucleotide und Purinbasen (MARKHAM und SMITH 1952).

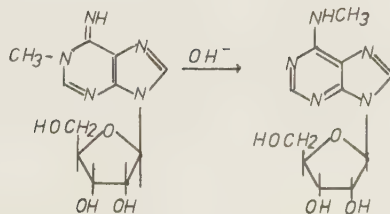
leichung 1:



Gleichung 2:



Gleichung 3:



Die geringere Stabilität der Zucker-Basenbindung bei Purinen wird auf eine stärkere Resonanzstabilisierung des Purinskeletts gegenüber dem Pyrimidinring zurückgeführt. Die hier angegebenen Reaktionsbedingungen führen zu keiner Veränderung der methylierten Basen.

KRÖGER et al., (1971) hydrolysieren RNA oder auch DNA mit 72%iger HClO_4 1 Stunde bei 100°C und erhalten Basen, Phosphate und Ribosen, die zum Teil gespalten sind. Die Basen sind unter diesen Bedingungen jedoch stabil.

3.1.1.3. Entsalzung des Hydrolysates.

Basenanalysen mit hohem Salzgehalt der Hydrolysate müssen, vor allem, wenn viele Komponenten getrennt werden sollen, vor der Chromatographie entsalzt werden. Die Trennung in der Verteilungschromatographie werden bei hohen Salzkonzentrationen unbefriedigend, da sich die stationäre Phase im Start ausbreitet und die Verteilungsisotherme keine Gerade mehr ist ("tailing"). Bei Ionenaustauschchromatographien führt eine erhöhte Ionenstärke zu undefinierten Ablöseeffekten, die die Trennung verschlechtern.

Zur Entsalzung der Nucleotidhydrolysate können diese mit folgendem Fließmittel auf Papier chromatographiert werden: 2-Propanol : H_2O (7 : 3) gesättigt mit NH_3 -Gas. Die Salze haben einen geringeren R_f -Wert als die Nucleotide. Diese Methode erwies sich als nicht sehr effektiv.

Die Entsalzung über Mischbettaustauscher empfiehlt sich nicht, da die aromatischen Reste der Nucleotide häufig unspezifisch an der Matrix des Austauschers hängen bleiben und so die quantitative Zusammensetzung der Probe verändert wird.

S. ZADRAZIL (1972) beschreibt die Entsalzung von Nucleinsäurebausteinen über Kohle als eine Routine-Methode. Diese Behandlung liefert gute Resultate und hat in der Regel keinen Effekt auf die quantitative Zusammensetzung der Probe. Die Kohle hält Nucleotide fest, Salze können mit Wasser ausgewaschen werden. Die Nucleotide werden danach mit einer Lösung von 10% Pyridin in 50%igem Äthanol eluiert (HALL).

Eine weitere einfache Methode der Salzentfernung ist das selektive Ausfällen z.B. von $KClO_4$ in der Kälte. Hierbei muß berücksichtigt werden, daß auch Basen (Purine) bei der Neutralisation leicht mit ausfallen.

Abbildung 11 zeigt die Chromatographie eines Hydrolysates von tRNA in 1 n HCl, das nicht entsalzt wurde. Deutlich zeigt sich die schlechte Qualität der Trennung, die keine exakte quantitative Auswertung zuläßt.

3.1.1.4. Trennung der Komponenten des Hydrolysates.

Nach jedem der angegebenen Hydrolyse-Verfahren müssen die entstandenen Komponenten speziell getrennt werden, da die Produkte der Reaktionen entweder Nucleotide, Nucleoside, Basen oder ein Gemisch derselben darstellen.

Die verwendeten Trennverfahren lassen sich im Prinzip auf Ionenaustausch- und Verteilungschromatographie zurückführen. Eine dritte Methode ist die Kombination einer Elektrophorese mit der Verteilungschromatographie.

Die meisten in der Literatur beschriebenen Trennverfahren werden auf Papier durchgeführt. Ionenaustauschchromatographie kann in Säulen oder auf Dünnschichtplatten (PEI-Cellulose) geschehen.



Abbildung 11: Autoradiographie eines RNA-Hydrolysates.

Hydrolyse in 1 n HCl 30 Min. bei 100° C. Die zweidimensionale Chromatographie wurde auf einer 20 x 20 cm Cellulose-Dünnschichtplatte nach BJORK und SVENSON (1967) durchgeführt, ohne die Probe vorher zu entsalzen. Die schlechte Trennleistung im Startbereich und die Schwanzbildung einiger Flecken ist auf den hohen Salzgehalt der Analysenprobe zurückzuführen.

BJORK und SVENSON (1967) geben zur Auftrennung ihres Hydrolysates folgende Methode an:
 Etwa 10 µl des Ansatzes (Konzentration jeder Komponente mindestens 0,5 µg) werden auf einer Cellulose-Dünnschicht-Platte in einer Ecke aufgetragen und ca. 7 Stunden in der ersten Dimension mit Fließmittel A (n-Butanol: H₂O : konz. NH₄OH, 86 : 14 : 4) und ungefähr 17 Stunden in der zweiten Dimension mit Fließmittel B (Isopropanol: konz. HCl : H₂O, 17 : 4 : 4) entwickelt. Das Substanzmuster, das diese Methode ergibt zeigt Abbildung 12.

Die Nucleotide bleiben in der ersten Dimension im Start liegen und werden erst bei niedrigen pH-Werten, also geringerer Ladung der Phosphatgruppe, in der zweiten Dimension aufgetrennt.

Zur papierchromatographischen Trennung von Nucleosiden können 5 verschiedene Fließmittel nach HACKER und MANDEL (1969) verwendet werden. Die R_f-Werte sind nach meinen Erfahrungen nur schlecht reproduzierbar.

Am geeignetsten zur Trennung der Basenbausteine der RNA sind zwei Fließmittelkombinationen von KAHLE et al. (1971), die zur zweidimensionalen Chromatographie auf Cellulose-Platten verwendet werden.

Die Abbildungen 13 A und B zeigen die Auftrennung der Basen in diesem System. Man sieht, daß in System 2 1-Methylguanin von 7-Methylguanin getrennt werden kann, was in System 1 nicht möglich ist. Durch Anwendung beider Systeme lassen sich die quantitativen Ergebnisse absichern.

Die Bestandteile des HCl-Hydrolysates von RNA können auch mit einer Kombination von Hochspannungselektrophorese und Dünnschichtchromatographie getrennt werden. Die Methode von AUGUSTI, TOCCO et al., (1968) wurde hier-

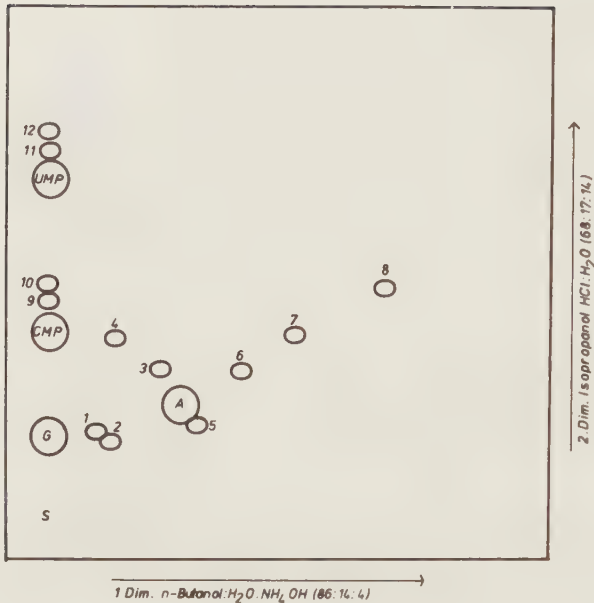
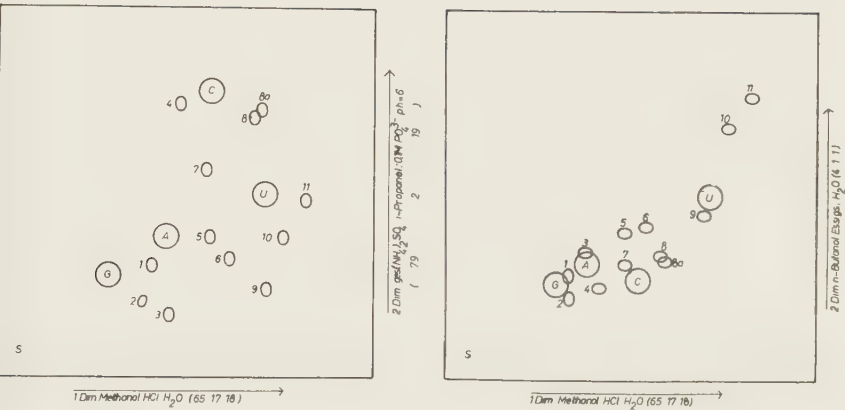


Abbildung 12: Schematische Darstellung einer zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie eines Ribonucleinsäurehydrolysates nach der Methode von BJORK und SVENSON (1967).

Die Nucleinsäure wird in 1 n HCl 30 Min. bei 100° C hydrolysiert. Das Hydrolysat enthält Pyrimidinmonophosphate und Purinbasen.

1 = 7-Methylguanin; 2 = 1-Methylguanin; 3 = 2-Dimethylguanin; 4 = 2-Methylguanin; 5 = 1-Methyladenin; 6 = 2-Methyladenin; 7 = 6-Methyladenin; 8 = 6-Dimethyladenin; 9 = 3-Methylcytidinmonophosphat; 10 = 5-Methylcytidinmonophosphat; 11 = 3-Methyluridinmonophosphat; 12 = 5-Methyluridinmonophosphat.



Abbildungen 13 A und 13 B: Schematische Zeichnung einer zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie von Adenin, Guanin, Cytosin, Uracil und von methylierten Basen auf 20 x 20 cm Cellulose-Flatten.

System A unterscheidet sich von B nur im Fließmittel der 2. Dimension.

1 = 7-Methylguanin; 2 = 1-Methylguanin; 3 = 2-Methylguanin;
 4 = nicht identifizierte Base X; 5 = 2-Methyladenin; 6 = 6-Methyladenin; 7 = 1-Methyladenin; 8 = 5-Methylcytosin; 8a = 3-Methylcytosin; 9 = 6-Dimethyladenin; 10 = 5-Methyluracil; 11 = 3-Methyluracil.

bei folgendermaßen modifiziert:

Die Probe wird in der ersten Dimension auf einer Cellulose-Platte 20 x 20 cm in 0,05 M Pyridin-Acetat-Puffer pH = 3,5 bei ca. 30 V/cm elektrophoretisiert. Hierbei wandern die Nucleotide entsprechend ihrer Nettoladung anodisch, während die Basen leicht kathodisch wandern. Die zweite Dimension wird dann chromatographiert (Fließmittel; 2-Propanol : konz. HCl : H₂O, 65 : 17 : 18). Der Ladungszustand jeder ionisierten Gruppe der Basen bzw. Nucleotide läßt sich nach der Gleichung berechnen:

$$\text{pH} = \text{pK} + \log \frac{\text{Protonenacceptor}}{\text{Protonendonator}}$$

Das Wanderungsverhalten der RNA-Bausteine in der Elektrophorese kann theoretisch ermittelt werden.

Zwei säulenchromatographische Methoden sind zur Isolierung größerer Mengen eines Nucleotides geeignet.

TOMLINSON und TENER (1963) trennten auf einer DEAE-Cellulose mit Tris-Formiatpuffer pH = 7,8 und 7 M Harnstoff durch einen Konzentrationsgradienten und pH-Änderungen Nucleotide von Nucleosiden und Dinucleotiden. Diese Methode findet Verwendung zur Strukturermittlung seltener Nucleotide, bei der größere Mengen einer Substanz erforderlich sind.

Bei einem anderen Verfahren wird die Trennung von 2' (3') Mononucleotiden an einer Anionenaustauscher-Säule (Dowex-1 x 8, Formiat) mit 0,1 - 1 M Ameisensäure erreicht. Der Nachteil hierbei ist die relativ niedrige Kapazität der Säule, so daß große Säulen zur Trennung größerer Substanzmengen benötigt werden (BANK et al., 1964; DUBIN und GRUNALP, 1967).

3.1.1.5. Nachweis und Identifizierung der Bestandteile.

Substanzen mit konjugierten Doppelbindungen, wie z.B. die Basen der Nucleinsäuren, absorbieren Licht im UV-Bereich. 10 - 15 µg Substanz sind auf Papier bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 260 nm gut zu erkennen. Auf dünnen Cellulose-Schichten lassen sich noch Substanzmengen von 0,5 µg auf diese Weise nachweisen. Eine Basenanalyse der Gesamt-tRNA liefert aber für die seltenen Basen nur ng-Mengen. So ist man gezwungen, einen anderen Nachweis zu suchen. Bei der Methylierung bietet sich die Markierung mit ^{14}C -Methylgruppen an. Der Nachweis "harter"- β -Strahler (^{32}P ; ^{14}C) ist durch Autoradiographie möglich. Die Lage der Substanz kann dann auf der Dünnschichtplatte markiert werden. Der ausgekratzte Fleck wird in Scintillatorlösung suspendiert und in einem Flüssigkeitsszintillationszähler gezählt. Die Radioaktivität ist ein Maß für die Substanzmenge.

Schwieriger als der Nachweis ist die Identifizierung der Substanzen. Methoden zur endgültigen Identifizierung sind Massenspektroskopie, UV-Spektroskopie und NMR-Spektren. Für alle diese Verfahren sind aber größere Substanzmengen notwendig als hier isoliert werden können. Als Identifizierung der Substanzen diene allein das übereinstimmende chromatographische Verhalten der Analysesubstanzen mit bekannten käuflichen Vergleichssubstanzen in verschiedenen Fließmitteln. Modifizierte Basen, für die keine Referenzsubstanz zu erhalten waren, müssen daher als nicht identifiziert angegeben werden.

3.1.2. Auswahl der verwendeten Methode.

Nach spezieller Aufgabe und Fragestellung der Arbeit wurde folgende Methode zur Bestimmung der Basenspezifität

tät gewählt.

Zur Präparation möglichst reiner tRNA aus einem Remethylierungsansatz in vitro, und aus Zellen nach in vivo Markierung wurde die Säulenchromatographie über DEAE-Cellulose verwendet. (Siehe Material und Methoden 2.6.1.)

Die DEAE-Cellulose wird vorgewaschen und mit Puffer A in der Säule equilibriert. Nach Auftragen der Substanz wird mit mindestens 50 ml Puffer A gewaschen und dann mit maximal 5 - 10 ml Puffer B die tRNA quantitativ eluiert.

- Siehe Abbildung 14 -

Ribosomale RNA kann nachfolgend mit Puffer C eluiert werden. Das Eluat wird dialysiert und am Rotationsverdampfer eingeengt. Die RNA wird dann mit dem 2,5fachen Volumen Äthanol (2%ig an Kaliumacetat) über Nacht (mindestens aber 4 Stunden) bei -20°C gefällt. Der abzentrifugierte Niederschlag wird zur Hydrolyse sorgfältig getrocknet.

Puffer A: 0,01 m MgAc_2 , 0,01 m EDTA pH = 4,8
(Standardpuffer) 0,25 m NaCl

Puffer B: Standardpuffer + 0,5 m NaCl

Puffer C: Standardpuffer + 1,2 m NaCl

Die analytische Reinheitsprüfung der tRNA ($0,5\text{ OD}_{260}$) wurde in einer 10%igen Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt (DINGMAN und PEACOCK 1968).

Die Säulenchromatographie über DEAE-Cellulose scheint eine Trennung von 4 S und 5 S RNA nicht zu ermöglichen, da die Stäbchengelelektrophorese des einheitlichen tRNA-Gipfels auch eine Bande im 5 S Bereich aufweist.

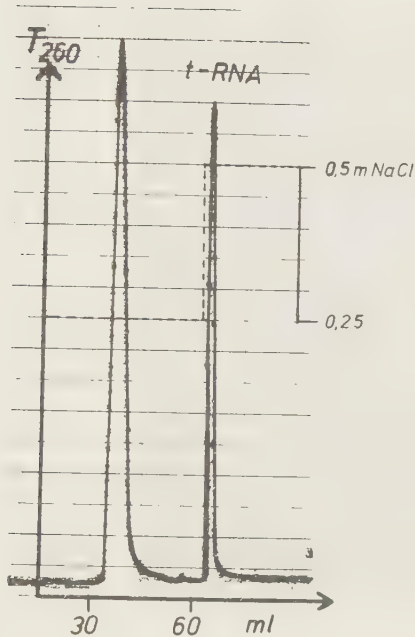


Abbildung 14: Originaldiagramm (Uvicord-Aufzeichnung) der Chromatographie eines Nucleinsäureextraktes aus *O.5 g B. subtilis* an einer DEAE-Cellulose Säule 1x2 cm.

Ordinate: Transmission bei 254 nm gemessen, als Maß für die Nucleinsäure- bzw. Proteinkonzentration.

Abszisse: Eluat in ml, bei konstanter Durchflußrate des Puffers. Der erste Gipfel enthält Oligonucleotide und Proteine, der zweite Gipfel enthält tRNA. Nach 60 ml Puffer A (0,25 m NaCl) wurde mit Puffer B (0,5 m NaCl) eluiert.

----- = m NaCl

_____ = Transmission bei 254 nm

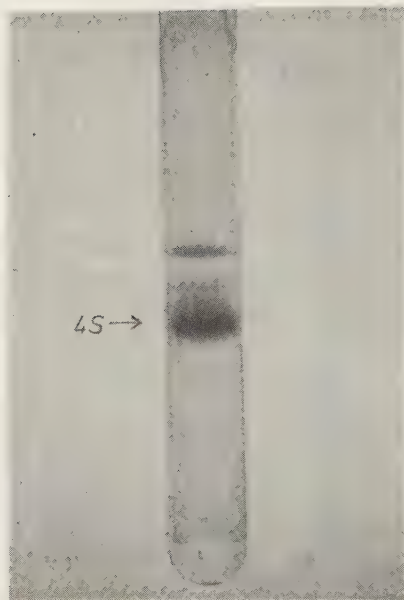


Abbildung 15: Stäbchengelelektrophorese von 0,5 OD₂₆₀ tRNA aus *B. subtilis*.

Die tRNA wurde an DEAE-Cellulose von Protein, Oligonucleotiden und hochmolekularer RNA nach vorstehender Methode gereinigt. Das Trenngel besteht aus 10% Polyacrylamid. Die Bedingungen der Elektrophorese sind in der Legende zu Abbildung 6 beschrieben.

Aus Abbildung 15 geht hervor, daß die Präparation keine hochmolekulare 16 S- oder 23 S-RNA enthält, da sonst eine Bande zwischen Sammel- und Trenngel auftreten müßte. Die beiden Banden oberhalb der 4 S-RNA sind wahrscheinlich Aggregate, da sie auch bei Auftrennung "reiner" tRNA auftreten.

Niedermolekulare Stoffe (Oligonucleotide) sind nicht nachweisbar. Eine Verunreinigung der tRNA Präparation durch 5 S-RNA ist bei der Analyse methylierter Basen ohne Bedeutung, da die 5 S-RNA nicht methyliert wird und somit keine Verfälschung der Analyse vorliegt.

Zur Hydrolyse wird die tRNA mit maximal 200 µl 70%iger HClO_4 quantitativ aus dem Zentrifugenglas in eine Glasampulle überführt. Nach Zuschmelzen der Ampulle wird die Hydrolyse über 60 Min. bei 100°C (am besten in siedendem Wasserbad) ausgeführt. Nach dem Abkühlen wird die Ampulle geöffnet und das Hydrolysat mit ca. 2 ml Aqua bidest. verdünnt.

Zur Reinigung des Hydrolysates muß Kohle nach folgender Prozedur vorbereitet werden: Gleiche Mengen Charcoal (Norit) und Celite 545 werden gemischt und in eine Glas-säule gefüllt. Die Säulenfüllung wird nun nacheinander mit großen Volumina folgender Lösungen gewaschen: 2 n HCl, 6 n NH_4OH , Wasser, Methanol, Ameisensäure und Wasser. Jedes Lösungsmittel muß vom nachfolgenden quantitativ ausgewaschen werden. Vor Benutzung wird die Kohle mindestens 8 Stunden bei 80°C aktiviert.

Das so vorbereitete Material wird zum Füllen von 1 x 1 cm Säulen verwendet. Besondere Bedeutung kommt der Abdichtung der Säule zu, da kleine Kohlepartikel leicht mit ausgewaschen werden. Dies geschieht am besten mit kleingeschnittener Glaswolle, einer Schicht äthanolgewaschenem Papierbreies und nochmals Glaswolle.

Die mit Wasser verdünnte Analysenlösung kann nun aufgebracht werden und mit 12 x 4 ml Aqua bidest. gewaschen werden. Eine Behandlung mit 12 x 4 ml 1 n HCl schließt sich an. Die auf der Kohle adsorbierten Basen können hiernach in ca. 2 x 4 ml konzentrierter Ameisensäure eluiert werden. Das Eluat wird in Spitzkölbchen am Rotationsverdampfer zur Trockne abgezogen. Die Basen werden hierauf in einer definierten Menge Wasser gelöst. Die Wassermenge richtet sich nach dem Gehalt an radioaktiven Basen. Als Richtwert können 100 µl H₂O für eine normale "in vivo" Basenanalyse angenommen werden. Die Methode für die Kohlevorbereitung und Reinigung der Analyse über Kohle ist von LAKINGS und GEHRKE (1971) beschrieben.

Zur Trennung der bei der Hydrolyse entstandenen Basen wird eine zweidimensionale Dünnschicht-Chromatographie verwendet. Man benutzt 20 x 20 cm Cellulose-DC-Platten ohne Fluoreszenzindikator der Fa. Merck. Von allen 4 Kanten der Platte entfernt man gleichmäßig ca. 1/2 cm der Celluloseschicht. Der Startpunkt wird in eine Ecke in 2 cm Abstand von jeder Kante gelegt. Aufgetragen werden optimal 10 µl der Analysenlösung unter dauerndem Trocknen und möglichst kleiner Auftragsfläche. Die Konzentration sollte nicht höher sein als zum Nachweis der Komponenten notwendig ist, da hohe Konzentrationen schlechte Trennung und irreguläres Laufverhalten zur Folge haben. Die Radioaktivität sollte zwischen 2×10^4 und 10×10^4 cpm betragen. Entwickelt werden die Platten in der 1. Dimension in Fließmittel A: Methanol / HCl / Wasser 65 : 17 : 18. Für die 2. Dimension stehen zwei verschiedene Fließmittel zur Verfügung B: n-Butanol / Eisessig / Wasser 4 : 1 : 1 oder C: gesätt. (NH₄)₂SO₄ / i-Propanol / 0,1 m Phosphat pH = 6, 79 : 2 : 19. Beide Fließmittel werden verwendet, da sie die einzelnen Basen unterschiedlich gut trennen.

Die Chromatographien werden bei Zimmertemperatur in Fließmittel-gesättigten Kammern ausgeführt. Wichtig ist, daß die DC-Platten zwischen den beiden Entwicklungen gut getrocknet werden, am besten in einem Vakuum-Exsiccator über KOH-Rotuli etc.. Auch vor der Autoradiographie ist gutes Trocknen der Platten sehr wichtig, da sonst chemische Reaktionen mit der Filmschicht vorkommen.

Zur Detektion durch Autoradiographie werden Röntgenfilme der Fa. Agfa Osray T₄ 24 x 30 oder von Dupont Domo medical X-RAY verwendet.

Die Belichtungsdauer hängt von der aufgetragenen Radioaktivität ab und beträgt für die oben angegebenen cpm zwischen 5 und 14 Tagen. Die Platten müssen mit der Schichtseite auf dem Film fixiert werden und die Plattengröße und -lage auf der Filmschicht durch Einkratzen gekennzeichnet werden. Entwickelt wird mit einem speziellen Röntgenentwickler (Agfa-Röntogen) nach dort angegebener Vorschrift. Durch das Übertragen der geschwärzten Flecken vom Film auf die DC-Platte kann man die Lage der radioaktiven "Spots" markieren.

Zur quantitativen Auswertung der Chromatogramme werden die Flecken auf den DC-Platten ausgekratzt, die Basen durch 100 µl 0,01 M HCl aus der Cellulose gelöst und Dioxanzsintillator (BRAY, 1960) zugegeben. Gezählt wird in einem Flüssigkeitsszintillationszähler. Der Löscheffekt beträgt maximal 10%.

Zur Kontrolle der Identität der Basen werden diese mit 0,01 M HCl aus der ausgekratzen Cellulose eluiert und nach Abzentrifugieren der Cellulose mit käuflichen Referenzsubstanzen auf DC-Cellulose-Platten chromatographiert. Fließmittel: 2-Propanol / 12 M HCl / H₂O 68 : 17,6 : 14,3 (HACKER 1969) . Das Auftragsvolumen der Probe und der darin gelösten Referenzsubstanzen soll so klein sein, wie möglich.

3.1.3. Kritik der Methode.

Auf Grund folgender Überlegungen und experimenteller Daten erscheint das beschriebene Analysenschema geeignet "halbquantitative" Analysen der methylierten Basen aus Gesamt-tRNA durchzuführen. Die Präparation auch kleiner Nucleinsäuremengen mit hohem Reinheitsgrad läßt sich leicht und schnell durch das angegebene Chromatographieverfahren über DEAE-Cellulose erreichen. Diese Trennung der RNA-Arten führt zu keinem Substanzverlust- im Gegensatz zu Verfahren, die auf anderen Prinzipien beruhen.

Von den chemischen Spaltungen ist die Perchlorsäure-Hydrolyse die geeignetste, weil sie ohne chemische Veränderung der Bausteine (siehe alkalische Hydrolyse) ausschließlich Basen, also einheitliche Reaktionsprodukte liefert. Damit ist eine einfache Methode der Entsalzung des Hydrolysates möglich. Die HCl-Hydrolyse liefert Basen und Nucleotide, eine anschließende Entsalzung ist nur über ein komplizierteres Verfahren möglich.

Die Auftrennung auf Dünnschicht-Platten anstelle von Papier ermöglicht kürzere Chromatographiezeiten, schärfere Trennungen, Nachweisbarkeit kleinerer Mengen und billigere Auswertung, da kleinere Filme zur Autoradiographie verwendet werden können.

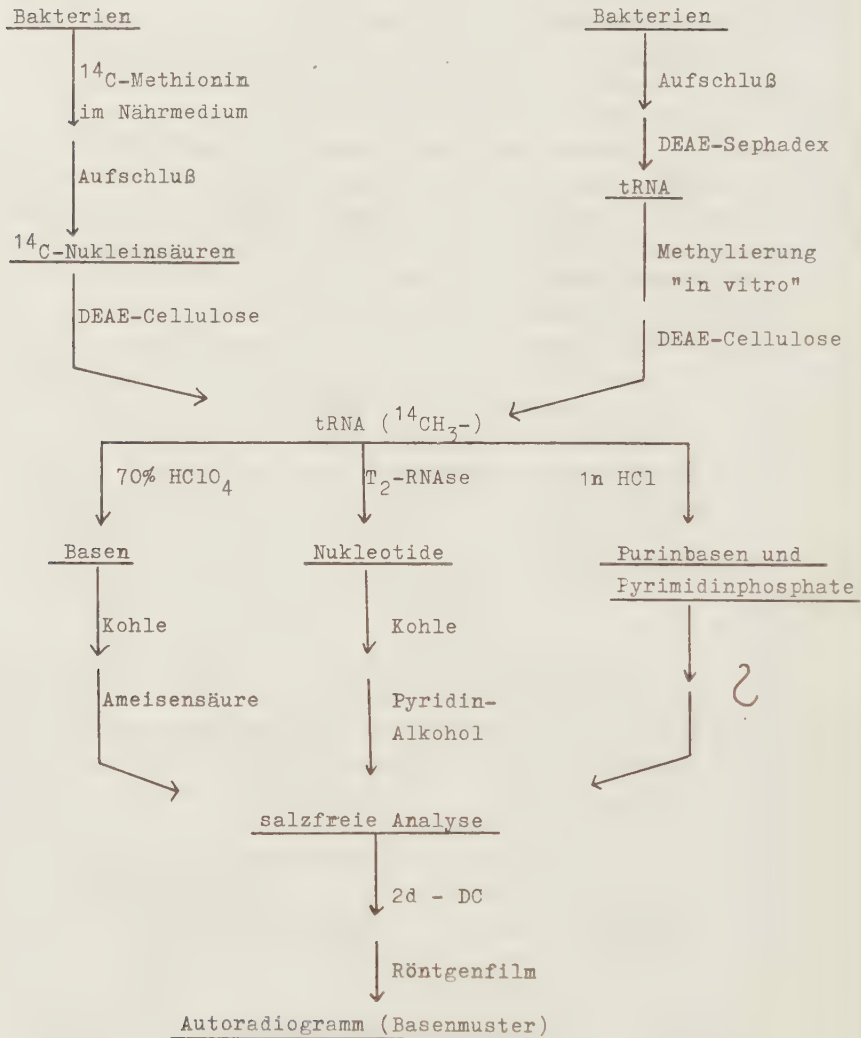
Das Verfahren über Kohle führt zu einer salzfreien und zuckerfreien Probe, die mit keinerlei Substanzverlust an methylierten Basen verbunden ist. Die Wiedergewinnung der aufgegebenen Substanzmenge liegt zwischen 90 und 100%.

Nachteil der Methode ist die Spaltung der Nucleoside, so daß zuckermethylierte Bausteine bei der Analyse

nicht erfaßt werden können. Sollen auch die Zucker-methylierungen analysiert werden, muß man die aufwendigere enzymatische Hydrolyse, die zu Nucleotiden führt, anwenden.

Chromatographische Verfahren führen im allgemeinen nicht zur endgültigen Identifizierung der getrennten Substanzen. In dieser Arbeit wurden die methylierten Basen durch Cochromatographie mit Referenzsubstanzen "vorläufig" identifiziert. Zur endgültigen Identifizierung (Massenspekt., UV-Spekt., NMR-Spekt.,) lag nicht genügend Substanz vor.

Schema der Analyse der methylierten Basen aus bakterieller tRNA.



3.2. Die methylierten Basen der tRNA in Mikroorganismen.

Das Muster der methylierten Basen der Gesamt-tRNA in Mikroorganismen wurde bisher nur von wenigen Bakterien erstellt. Meist sind die Daten hierbei aus verschiedenen Experimenten zusammengetragen (HALL 1971). In der Fragestellung der Arbeit ist die Kenntnis der methylierten Basen der tRNA aus *B. subtilis* zur Kontrolle einer veränderten Methylierung nach Factamycineinwirkung auf diese Keime notwendig.

Das Methylierungsmuster der tRNA aus *E. coli* wurde meines Wissens bisher von keiner Arbeitsgruppe systematisch mit einem Analysenverfahren untersucht. Dies nachzuholen, und um die hier verwendete Methode durch Vergleich mit einigen Literaturwerten zu überprüfen, wurde *E. coli* tRNA analysiert. Außerdem ergab sich dadurch die Möglichkeit, das Muster der methylierten Basen der tRNA aus grampositiven (*B. subtilis*) und gramnegativen (*E. coli*) Keimen zu vergleichen.

3.2.1. *Bacillus subtilis* W 23.

B. subtilis W 23 wurde in 100 ml Minimalmedium nach "Nakada" gezüchtet, wobei das Wachstum durch Absorptionsmessung bei 578 nm in einer 1 cm Glasküvette verfolgt wurde. Die spezifische Radioaktivität des ^{14}C -Methionins betrug bei diesen Experimenten 100 $\mu\text{Ci}/3,5 \mu\text{Mol}$ pro 100 ml. Die Bakterien nahmen bei drei verschiedenen Versuchen zwischen 75 und 90% des Methionins aus dem Medium auf. Diese Werte ergeben sich aus der Differenz der eingesetzten Radioaktivität und der Aktivität, die nach Abzentrifugieren der Bakterien im Medium verbleibt. Die Ausbeute an Keimen lag bei 100 ml Medium zwischen 0,5 und 0,6 g Bakterienfeuchtgewicht. Bei der Aufarbeitung konnten ca. 40 OD₂₆₀ tRNA pro 0,5 g Bakterien isoliert

werden. Die durchschnittliche spezifische Radioaktivität der isolierten tRNA war 3×10^4 cpm/ OD₂₆₀ tRNA. Die experimentellen Daten sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1

In vivo-Markierung von *B. subtilis* W 23

Nr.	einges. spezif. Radioaktivität ($\mu\text{Ci}/\mu\text{Mol}$)	Bakterien- ausbeute (g)	tRNA- ausbeute (OD ₂₆₀)	cpm pro OD tRNA	Aufnahme ¹⁴ C-Methion. (%)
1	100/3,5	0,5	42	4×10^4	80
2	"	0,5	40	3×10^4	74
3	"	0,6	48	$2,7 \times 10^4$	90

Bei der Hydrolyse und Aufarbeitung des Hydrolysates an Aktivkohle wurden ca. 20% der Radioaktivität verloren. Dieser Betrag entspricht der Zuckermehtylierung und dem an Met-tRNA^{met} acylierten Methionin. Beides wird bei der sauren Hydrolyse abgespalten. Die qualitative Zusammensetzung der methylierten Basen in tRNA aus *B. subt.* W 23 zeigen die Abbildungen 16 A und B. Um eine möglichst genaue quantitative Auswertung der Analysen zu ermöglichen, wurden immer zwei Chromatographien mit verschiedenen Fließmitteln der 2. Dimension durchgeführt.

Der Tabelle 2 kann entnommen werden, daß die Hauptmenge der Methylgruppen auf Guanin (in Stellung 1 und 7) und

auf Adenin (in Stellung 1 und 2) entfällt. Alle anderen methylierten Basen machen zusammen ca. 20% der gesamten Methylierung der tRNA aus.

- Tabelle 2 siehe nächste Seite -

Die angegebenen Zahlen stellen, für jedes Chromatographie-System getrennt, die gemittelten Werte aus drei Experimenten dar. Die in Klammern angegebenen Zahlen geben die größte gefundene absolute Abweichung in % vom Mittelwert an.

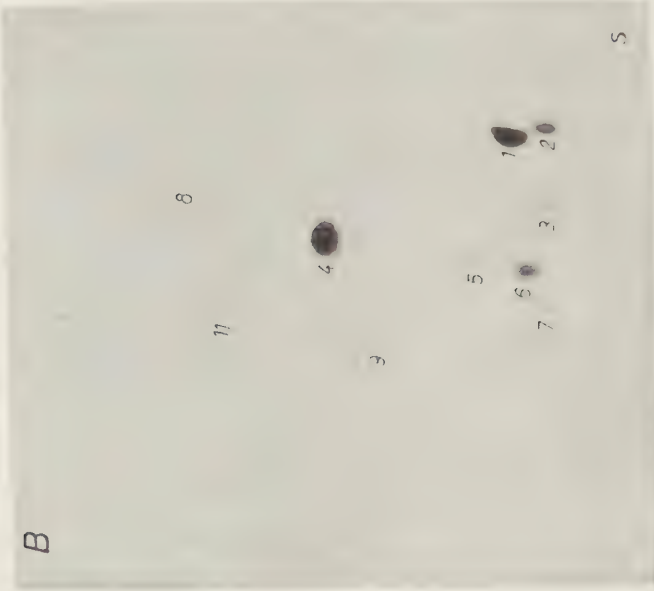
Die gesamte Radioaktivität, die auf die Platten aufgetragen wurde (30 - 60 000 cpm), konnte zu 90% wieder gefunden werden, was einem Löscheffekt durch die Cellulose von 10% entspricht, der nicht berücksichtigt wurde, da nur die relative Verteilung der einzelnen Basen für die Fragestellung von Interesse war. Basen, die mit weniger als 1% an der Gesamtradioaktivität beteiligt sind (siehe Tabelle), ergaben bei den Analysen mindestens 100 cpm, was deutlich über dem Leerwert des Zählgerätes liegt und als Einbau von CH_3 -Gruppen in die Basen bezeichnet werden kann.

Die in Tabelle 2 mit „X“ bezeichnete Base konnte nicht identifiziert werden, da keine Vergleichssubstanz zur Verfügung stand. Das chromatographische Verhalten in beiden Systemen spricht für eine stark apolare Base, die eine Methylgruppe tragen muß. In Frage käme hier 2-Thiomethyl-6-isopentenyladenin, das in einigen tRNA-Species vorkommt.

Abbildungen 16 A und 16 B: Darstellung des Musters der $^{14}\text{CH}_3$ markierten methylierten Basen der tRNA aus *B. subtilis* W 23 durch Autoradiographie.

Die Markierung, Hydrolyse und zweidimensionale chromatographische Auftrennung sind unter 3.1.2. beschrieben. Flecken mit gleichen Nummern sind in beiden Chromatographie-Systemen identisch. System A unterscheidet sich vom System B nur durch das Fließmittel der 2. Dimension. Die aufgetragene Radioaktivität beträgt für A = 50 000, für B = 50 000 cpm. Relative Verteilung und Identität der methylierten Basen sind in Tabelle 2 zusammenge stellt.

2. Dim. Fließmittel C



1. Dim. Fließmittel A



1. Dim. Fließmittel A

2. Dim. Fließmittel B

Tabelle 2

Relative Häufigkeit der methylierten Basen der tRNA von
B. subtilis in Prozent der Gesamt-Methylierung von tRNA.

Nr.	Verbindung	Prozent der Gesamt-Radioaktivität in Methylgruppen	
		DC-System A	DC-System B
1	7-Methylguanin	43,8 (2,0)	32,2 (1,2)
2	1-Methylguanin		10,1 (0,5)
3	2-Methylguanin	4,9 (0,9)	5,5 (0,5)
4	1-Methyladenin	22,8 (0,2)	23,0 (0,2)
5	2-Methyladenin	13,0 (2,0)	10,7 (1,0)
6	6-Methyladenin	4,6 (0,6)	5,0 (0,4)
7	6-Dimethyladenin	3,0 (0,1)	3,0 (0,2)
8	5-Methylcytosin	2,4 (0,5)	2,0 (0,9)
9	5-Methyluracil	< 1,0	2,5 (1,0)
10	3-Methyluracil	---	< 1,0
11	X-nicht identif.	3,4 (0,3)	3,2 (0,2)

3.2.2. Met⁻ ind⁻ rel⁺ Mutante von *B. subtilis*.

Diese Mutante wurde deshalb bezüglich des Basenmusters der tRNA analysiert, weil geprüft werden sollte, ob bei Methioninmangel in diesem Keim untermethylierte tRNA entsteht.

Markiert man eine für Methionin a uxotrophe Mutante von *B. subtilis* mit ausreichend ¹⁴C-Methionin (100 µCi/7 µMol) und analysiert dann die methylierten Basen der tRNA, ergibt sich ein etwas anderes Bild als im Wildtyp. Es konnte in diesem Keim kein 6-Dimethyladenin nachgewiesen werden, was in der tRNA des Wildtyps mit 5% relativer Häufigkeit gefunden worden war.

- Siehe Abbildung 17 und Tabelle 3 -

Die Ursache dieses Unterschiedes kann mit dem Fehlen an 6-Dimethyladeninmethyltransferase erklärt werden. Das Enzym könnte aber auch vorkommen und durch Inhibition inaktiviert werden.

Eine andere Möglichkeit wäre eine Veränderung des Substrates, das dadurch vom zugehörigen Enzym nicht mehr gebunden werden kann, bzw. die richtige Base nicht mehr erkannt wird.

3.2.3. *E. coli* MRE 600.

Die methylierten Basen von *E. coli* tRNA sind bekannt (MONIER et al., 1960; OSAWA 1960; DUNN et al., 1960). Das Muster der methylierten Basen der tRNA aus *E. coli* MRE 600 wurde in den Experimenten dieser Arbeit zur Kontrolle der Methode und zum Vergleich der Methylierung von tRNA in grampositiven und gramnegativen Keimen herangezogen. Die radioaktive Markierung geschah in gleicher Weise wie bei *B. subtilis*.

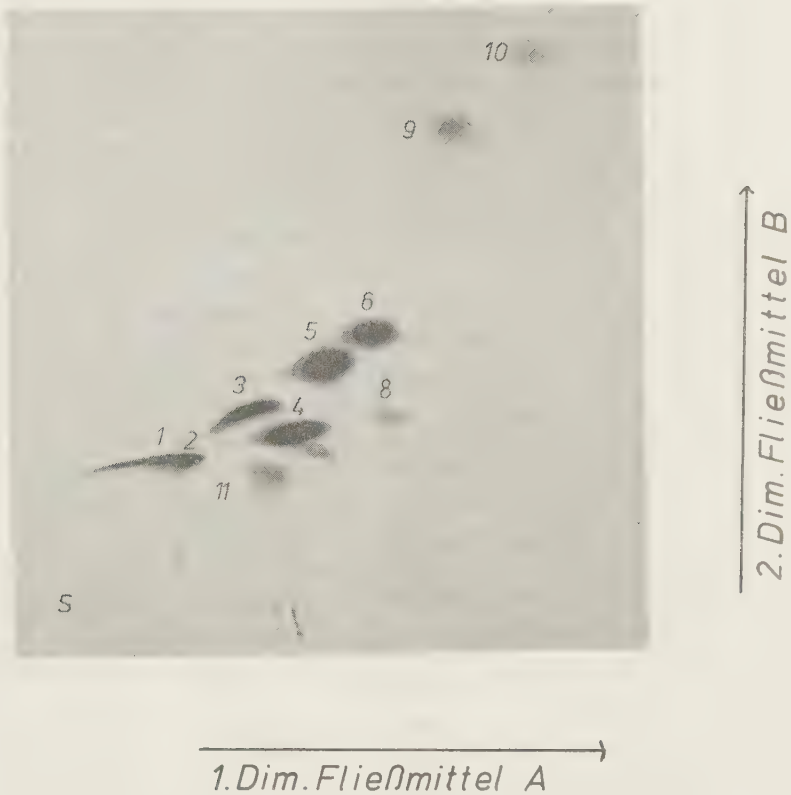


Abbildung 17: Darstellung des Musters der $^{14}\text{CH}_3$ markierten methylierten Basen der tRNA aus *B. subtilis* met⁻ durch Autoradiographie.

Die methylierten Basen wurden durch zweidimensionale Cellulose-DC getrennt und quantitativ bestimmt. Alle Bedingungen des Experiments sind unter 3.1.2. beschrieben. Die Bedeutung der Ziffern und die relativen Mengen der methylierten Basen sind aus der Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 3

Relative Mengen der methylierten Basen in
tRNA von *B. subtilis* met⁻.

Nr.	Verbindung	% der Gesamt- Radioaktivität in Methylgruppen
1	7-Methylguanin	40,5
2	1-Methylguanin	
3	2-Methylguanin	6,6
4	1-Methyladenin	21,0
5	2-Methyladenin	15,4
6	6-Methyladenin	8,0
7	6-Dimethyladenin	---
8	5-Methylcytosin	1,6
9	5-Methyluracil	2,9
10	3-Methyluracil	2,0
11	X-nicht identif.	2,6

Die Bakterien wurden in einem für *Escherichia coli* gebräuchlichen Minimal-Medium gezüchtet. Die gefundenen Basen und die relativen Mengen dieser Basen stimmen mit den Literaturwerten gut überein. Selbst seltene Basen der *E. coli* tRNA, wie 2-Methylguanin und 6-Methyladenin, können mit dem verwendeten Verfahren gefunden werden. Das Ergebnis der Chromatographie von *E. coli* tRNA zeigen die Autoradiographien in den Abbildungen 18 A und B (siehe nächste Seite).

Die Analyse erbringt eine deutlich andere Basenzusammensetzung der tRNA von *E. coli* als der von *B. subtilis*, (siehe Tabelle 4). Sowohl die Art der vorkommenden modifizierten Basen, als auch die Mengen einiger gemeinsam vorhandener Basen sind stark unterschiedlich. Beide Organismen enthalten m^1 -Guanin, m^7 -Guanin, m^2 -Guanin, m^6 -Adenin, m^2 -Adenin, m^5 -Uracil, (m^3 -Cytosin), (m^5 -Cytosin) und die nicht identifizierte Base "X". Nur in *B. subtilis* tRNA kommen die Basen m_2^6 -Adenin, m^1 -Adenin und m^3 -Uracil vor, während allein *E. coli* tRNA eine zweite nicht identifizierte Base "Z" enthält.

- Siehe Tabelle 4 -

Die relative Häufigkeit von m^1 -Guanin, m^7 -Guanin und m^2 -Adenin ist ungefähr die gleiche in beiden Stämmen. Die Mengen der Basen m^5 -Uracil und m^1 -Adenin unterscheiden sich erheblich voneinander. Während *E. coli* tRNA keinerlei m^1 -Adenin enthält, kommt diese Substanz in *B. subtilis* zu ca. 23% aller methylierten Basen vor. Die Verbindung m^5 -Uracil oder Ribothymidin (r T = T), die bisher in allen sequenzierten tRNAs aus *E. coli* und den meisten tRNAs aus höheren Organismen gefunden wurde, macht 43% der methylierten Basen der *E. coli* tRNA aus. Der Anteil von m^5 -Uracil an den methylierten Basen

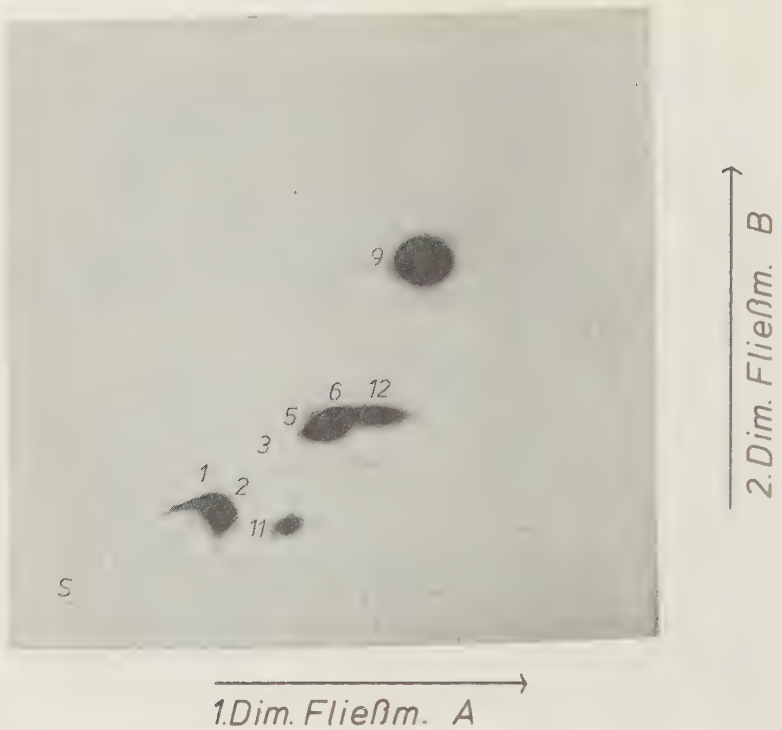


Abbildung 18 A: Autoradiographie des Dünnschichtchromatogrammes der methylierten Basen der tRNA aus *E. coli* MRE 600.

Die Zellen wurden mit ^{14}C -Methionin in Minimalmedium gezüchtet. Die radioaktiv markierte tRNA wurde in HClO_4 hydrolysiert und die Basenbausteine durch zweidimensionale Chromatographie auf Cellulose-Dünnschichtplatten getrennt. Die Fließmittel sind in 3.1.2. angegeben. Pro Platte wurden 60 000 cpm aufgetragen. Die relativen Mengen der methylierten Basen stehen in Tabelle 4.

1 = 7-Methylguanin; 2 = 1-Methylguanin; 3 = 2-Methylguanin;
 5 = 2-Methyladenin; 6 = 6-Methyladenin; 9 = 5-Methyluracil;
 11 = X-nicht identifiziert; 12 = Z-nicht identifiziert.



1. Dim. Fließmittel A

Abbildung 18 B: Darstellung des Musters der $^{14}\text{CH}_3$ - markierten methylierten Basen der tRNA aus *E. coli* MRE 600 durch Autoradiographie.

Alle Bedingungen wie in Abb. 18 A, nur das Fließmittel der 2. Dimension ist geändert.

Tabelle 4

Relative Mengen der methylierten Basen in tRNA
von E. coli MRE 600.

Nr.	Verbindung	Prozent der Gesamt-Radioaktivität in Methylgruppen	
		DC-System A	DC-System B
1	7-Methylguanin	36,8	30,0
2	1-Methylguanin		4,1
3	2-Methylguanin	< 1,0	< 1,0
4	1-Methyladenin	entfällt	entfällt
5	2-Methyladenin	11,1	13,0
6	6-Methyladenin	2,7	2,1
7	6-Dimethyladenin	entfällt	entfällt
8	5-Methylcytosin	< 1,0	< 1,0
9	5-Methyluracil	43,8	43,5
10	3-Methyluracil	< 1,0	< 1,0
11	X-nicht identif.	5,8	5,7
12	Z-nicht identif.	2,2	2,2

der *B. subtilis* tRNA beträgt in den durchgeführten Experimenten maximal 2,5%.

Zusammenfassend läßt sich feststellen:

Die Methode der Basenanalyse, die hier angewendet wurde, ergibt gut reproduzierbare Ergebnisse, die mit Literaturresultaten, die 1973 veröffentlicht wurden, als diese Arbeit abgeschlossen war, im Einklang stehen. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind zur Publikation angenommen und im Druck.

In Tabelle 5 werden die Werte der Basenanalyse von *B. subtilis* mit Literaturwerten verglichen.

Tabelle 5

Mengen der methylierten Basen aus *B. subtilis* tRNA im Vergleich zu Analysenergebnissen, die der Literatur entnommen wurden.^a

methy- l. Basen	m ⁷ G+m ¹ G	m ⁵ U	m ² A	m ¹ A	übrige	total
Literatur- werte (%)	48,8	4,2	17,6	29,9	----	100,5
eigene Ergebnisse (%)	42,3	2,5	10,7	23,0	20	98,5

a = KLAGSBRUNN (1973)

Vermindert man die Literaturwerte um den 20%igen Anteil der Basen, die in der zitierten Arbeit nicht berücksichtigt wurden, so ergibt sich eine sehr gute Übereinstimmung der Resultate.

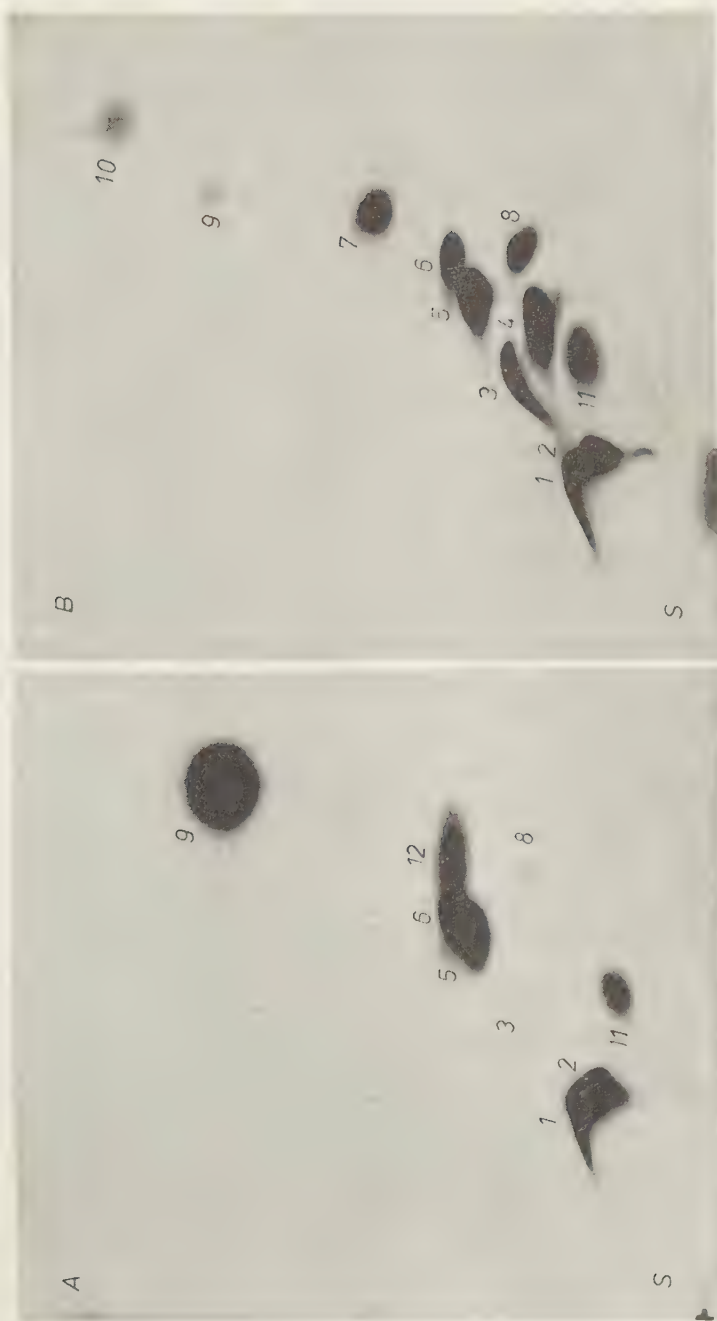
Das Verfahren erlaubt das Auffinden kleinster Mengen methylierter Basen, soweit die spezifische Radioaktivität der Probe hoch genug gewählt wird.

Verschiedene Stämme gleicher Bakterienarten (*B. subt.* W 23 und *B. subtilis* met⁻ ind⁻ rel⁺) haben nicht unbedingt gleiche Methylierungsmuster der tRNA.

Die Basenzusammensetzung der tRNA von grampositiven (*B. subtilis*) und gramnegativen (*E. coli*) Keimen unterscheidet sich drastisch durch verschiedenartige Methylierung. Aus den Ergebnissen ist zu ersehen, daß *B. subt.* Zellen kein bzw. nur wenig 5-Methyluracil besitzen, jedoch viel 1-Methyladenin, das in *E. coli* tRNA nicht zu finden ist. Die Verhältnisse in den tRNAs beider Keime sind in Tabelle 6 und Abbildung 19 zum Vergleich zusammengefaßt.

Abbildung 13: Autoradiographische Darstellung des dünnsschichtchromatographisch getrennten tRNA - Hydrolysates aus E. coli MRE 600 (A) und B. subtilis W 23 (B).

Der Vergleich der ^{14}C -Methionin markierten methylierten Basen der tRNA beider Keime zeigt deutliche Unterschiede auf. Die experimentellen Bedingungen zu diesen Bildern sind in 3.2.1 genau beschrieben. Die Bedeutung der Ziffern und die relative Häufigkeit der methylierten Basen sind aus Tabelle 6 zu entnehmen. (Siehe nächste Seite).



2. Dim. Fließm. B

1. Dim. Fließm. A

Tabelle 6

Vergleich der relativen Häufigkeiten methylierter Basen in tRNA aus *E. coli* MRE 600 und *B. subtilis*.

Nr.	Verbindung	Prozent der Gesamt-Radioaktivität in Methylgruppen	
		<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>
1	7-Methylguanin	30,0	32,2
2	1-Methylguanin	4,1	10,1
3	2-Methylguanin	< 1,0	5,5
4	1-Methyladenin	---	23,0
5	2-Methyladenin	13,0	10,7
6	6-Methyladenin	2,1	5,0
7	6-Dimethyladenin	---	3,0
8	5-Methylcytosin	< 1,0	2,0
9	5-Methyluracil	43,5	2,5
10	3-Methyluracil	< 1,0	< 1,0
11	X-nicht identif.	5,7	3,2
12	Z-nicht identif.	2,2	---

3.3. tRNA-Methyltransferaseaktivitäten in *B. subtilis* und *E. coli*.

Für die unterschiedliche Verteilung der methylierten Basen in *E. coli* und *B. subtilis* tRNA gibt es theoretisch zwei Gründe: Erstens kann das Substrat für das zugehörige Enzym in dem jeweiligen Keim nicht vorhanden sein. Dies bedeutet, daß entweder die Base in einer vom Enzym nicht erkennbaren Sequenz vorkommt, oder, daß das gesamte tRNA-Molekül eine Raumstruktur besitzt, die die Bindung ans Enzym verhindert.

Der zweite Grund kann im Fehlen der Methyltransferase selbst bzw. deren Aktivität liegen. Um diese beiden Arbeitshypothesen zu testen, wurden in vitro untermethylierte tRNAs aus *B. subtilis* mit *E. coli* Enzymen und umgekehrt untermethylierte tRNAs aus *E. coli* mit *B. subtilis* Enzymen umgesetzt. Als Enzym-Quelle dienten zellfreie Extrakte der Bakterien.

Die Untermethylierung der tRNA wurde bei *B. subtilis* durch Pactamycinbehandlung erhalten (KERSTEN et. al., 1968), bei *E. coli* durch Methioninhunger der $met^- rel^-$ Mutante (FLEISSNER und BOREK, 1962). Die Analyse der methylierten Basen der in vitro markierten tRNAs aus *B. subtilis* mit *E. coli* Enzymen zeigt große Übereinstimmung mit dem Muster, das bei der Markierung der tRNA wachsender *E. coli* Zellen erhalten wurde.

Das Muster der methylierten Basen der *E. coli* tRNA, die mit *B. subtilis* Enzymen remethyliert wurde, stimmt ziemlich genau mit dem nativen Methylierungsmuster der *B. subtilis* tRNA überein. Die Ähnlichkeit der Basenmuster ist also eine Funktion der Enzymextrakte. Die Enzyme synthetisieren nahezu die gleichen Methylgruppen an die Basen des heterologen Substrats wie an das

Abbildung 20: Darstellung eines Dünnschichtchromatogrammes der Basen einer remethylierten tRNA aus methioningehungerten *E. coli met⁻ rel⁻* durch Autoradiographie.

Zur in vitro Methylierung wurden Enzyme aus *B. subtilis* W 23 und ^{14}C -SAM verwendet. Die Bedingungen der enzymatischen Methylierung, Hydrolyse und Chromatographie: siehe Material und Methoden. A und B zeigen verschiedenartige chromatographische Trennungen der methylierten Basen des gleichen tRNA - Hydrolysates.

1 = 7-Methylguanin; 2 = 1-Methylguanin; 3 = 2-Methylguanin; 4 = 1-Methyladenin;
5 = 2-Methyladenin; 7 = 6-Dimethyladenin; 11 = X-nicht identifiziert.

72
2.Dim.Fließmittel C ←



→ 1.Dim.Fließmittel A

← 1.Dim.Fließmittel B



Abbildung 21: Autoradiographische Darstellung der Dünnschichtchromatographie des Säure-Hydrolysates einer untermethylierten *B. subtilis*-tRNA remethyliert mit einem Enzymextrakt aus *E. coli* MRE 600.

Experimentelle Bedingungen, siehe Material und Methoden. Die heterologe Remethylierung ergibt folgende Basen:

1 = 7-Methylguanin; 2 = 1-Methylguanin (in diesem System sind die beiden Basen nicht zu trennen); 3 = 2-Methylguanin; 4 = 1-Methyladenin; 5 = 2-Methyladenin; 6 = 6-Methyladenin; 8 = 5-Methylcytosin; 9 = 5-Methyluracil; 11 = X-nicht identifiziert.

Tabelle 7

Relatives Vorkommen der methylierten Basen nach Remethylierung untermethylierter tRNAs aus *B. subtilis* oder *E. coli* mit den jeweils heterologen Enzymen.

Nr.	Verbindung	Prozent der Gesamt-Radioaktivität in Methylgruppen	
		tRNA: <i>E. coli</i> Enzyme: <i>B. subt.</i>	tRNA: <i>B. subt.</i> Enzyme: <i>E. coli</i>
1	7-Methylguanin	54,0	45,0
2	1-Methylguanin		
3	2-Methylguanin	1,7	< 1,0
4	1-Methyladenin	26,0	< 1,0
5	2-Methyladenin	11,0	< 1,0
6	6-Methyladenin	---	< 1,0
7	6-Dimethyladenin	4,4	---
8	5-Methylcytosin	---	< 1,0
9	5-Methyluracil	---	54,0
10	---	---	---
11	X-nicht identif.	2,9	< 1,0

Substrat des eigenen Organismus. Dies bedeutet, daß die Methylierung mit einer großen Basenspezifität geschieht, wobei es unbedeutend scheint, aus welchem Organismus das Substrat stammt.

3.4. Die methylierten Basen der rRNA in *B. subtilis*.

Dieses Experiment wurde wie alle anderen Basenanalysen durchgeführt, nur wurde nach Elution der tRNA von der DEAE-Cellulose-Säule mit 1,2 M NaCl bei Zimmertemperatur nachgewaschen. Nach TAKANAMI (1970 a,b) und COMB et al., (1967) soll unter diesen Bedingungen die rRNA eluiert werden. Dieser Anteil des Eluates ergab nach Hydrolyse und zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie die Muster, die in den Abbildungen 22 A und B gezeigt sind.

Verglichen mit der tRNA treten größere Mengen an 2-Methylguanin und 6-Methyladenin auf, wohingegen die Basen 1-Methylguanin und 1-Methyladenin ganz oder fast ganz verschwinden. Die beiden methylierten Cytosine nehmen anteilig stark zu. Die noch unidentifizierte Base "X" ist offensichtlich ausschließlich ein Bestandteil der tRNA.

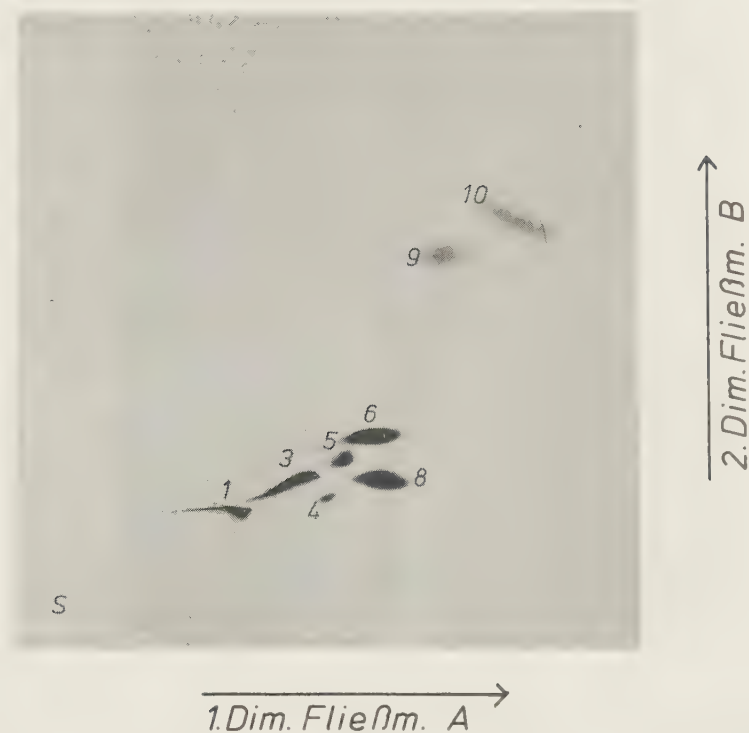


Abbildung 22 A: Autoradiographie des Dünnschichtchromatogrammes der methylierten Basen der rRNA aus B. subt.

Die Basen wurden in wachsenden Keimen mit $^{14}\text{CH}_3$ -Methionin markiert. Gewinnung der RNA, Hydrolyse und Chromatographie wie in 3.2.1. beschrieben.

1 = 7-Methylguanin; 3 = 2-Methylguanin; 4 = 1-Methyladenin;
5 = 2-Methyladenin; 6 = 6-Methyladenin; 8 = 3- und 5-Methylcytosin; 9 = 5-Methyluracil; 10 = 3-Methyluracil.

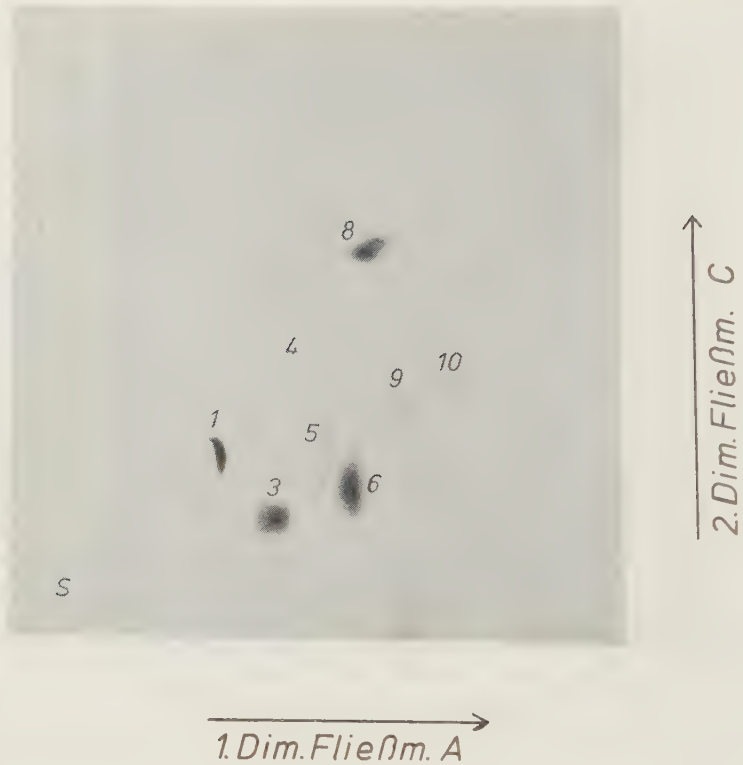


Abbildung 22 B: Autoradiographie des Dünnschichtchromatogrammes des gleichen rRNA-Hydrolysates wie in Abbildung 22 A.

Das Fließmittel der 2. Dimension (C) ist geändert und steht in 3.2.1. Die Ziffern bezeichnen die gleichen methylierten Basen wie in 22 A.

3.5. Einfluß von Pactamycin auf die Methylierung von RNA.

Es gibt zwei experimentelle Möglichkeiten, die Methylierung bakterieller RNA und ihre Beeinflussung durch Pactamycin zu untersuchen.

a) in vivo Experimente:

In unserem Arbeitskreis wurden von LINKEMANN (1968) und W. SCHMIDT (1973) Bakterien in Parallelansätzen während der Züchtung durch Zugabe von ^3H -Uridin und ^3H -Methionin radioaktiv markiert. Die Uridinaufnahme in säurefällbares Material ist ein Maß für die Netto-RNA-Syntheserate, der Einbau von Methylgruppen in RNA ein Maß für die nachfolgende Methylierung. Die Verkleinerung des Quotienten aus " CH_3 "- und Uridineinbau in mit Pactamycin behandelten Keimen zeigt die Entkopplung der Transcription und der Modifikation von RNA durch Methyltransferasen. Die Ergebnisse zeigten, daß Pactamycin die Methylierung der tRNA aus *B. subtilis* - bei erhöhter RNA-Syntheserate - verhindert.

Führt man eine $^{14}\text{CH}_3$ -Methionin-Markierung in *B. subtilis* mit so hohen Konzentrationen durch, daß der Einbau über längere Zeit linear bleibt, und berechnet dann die spezifische Radioaktivität der RNA, läßt sich die Anzahl der Methylgruppen pro Molekül tRNA nach folgender Gleichung ermitteln.

$$\frac{\text{dpm} \cdot 1,8 \cdot 10^{-3}}{2,2 \cdot 10^6 \cdot R_{\text{spez}} \cdot \text{OD}_{260}} = \text{pMol CH}_3 / \text{pMol tRNA}$$

$$1,8 \cdot 10^{-3} = \text{Umrechnungsfaktor von } \text{OD}_{260} \text{ auf pMol tRNA bei mittlerem MG von 25 000}$$

$$R_{\text{spez}} = \text{eingesetzte spez. Radioaktivität } (\mu\text{Ci/pMol})$$

$$2,2 \cdot 10^6 \text{ dpm} = 1 \mu\text{Ci}$$

Die Kalkulation des Methylgruppengehaltes der tRNA aus *B. subtilis* auf Grund der Daten, die bei in vivo Markierungen erhalten wurden (SCHMIDT und ARNOLD), ergibt einen Gehalt von 2-3 Methylgruppen pro Molekül *B. subt.* tRNA. Das stimmt mit dem mittleren Methylgruppengehalt von *E. coli* tRNAs etwa überein.

Behandelt man die Keime mit Pactamycin, ergibt sich für die isolierte tRNA ein Gehalt von 0,6 - 0,9 Methylgruppen pro Molekül tRNA.

Die scheinbare Untermethylierung liegt also zwischen 2/3 und 3/4 einer völlig untermethylierten tRNA.

b) in vitro Experimente:

Hierzu werden RNAs aus Keimen isoliert, die mit oder ohne Antibiotikum im Nährmedium wuchsen. Die Pactamycindosis wurde so gewählt, daß das Wachstum nur partiell gehemmt war. Die isolierte RNA dient als Substrat für einen Enzymextrakt (S-100), der alle Methylaseaktivitäten enthält. Mit S-Adenosylmethionin als Cosubstrat kann die RNA im Reagenzglas methyliert werden. Das Ausmaß der Methylgruppenaufnahme in der Kontrolle und in behandelten Keimen wurde zur Feststellung der "Untermethylierung" der RNA aus *B. subtilis* nach Pactamycin herangezogen.

Alle im folgenden beschriebenen Versuche wurden unter Bedingungen durchgeführt, die in der Legende zu Abbildung 23 angegeben sind. Aus dem Wachstumsverlauf beider Kulturen ist zu ersehen, daß die Pactamycinzugabe zum Nährmedium zu einer 30 - 40%igen Wachstums-
hemmung führt.

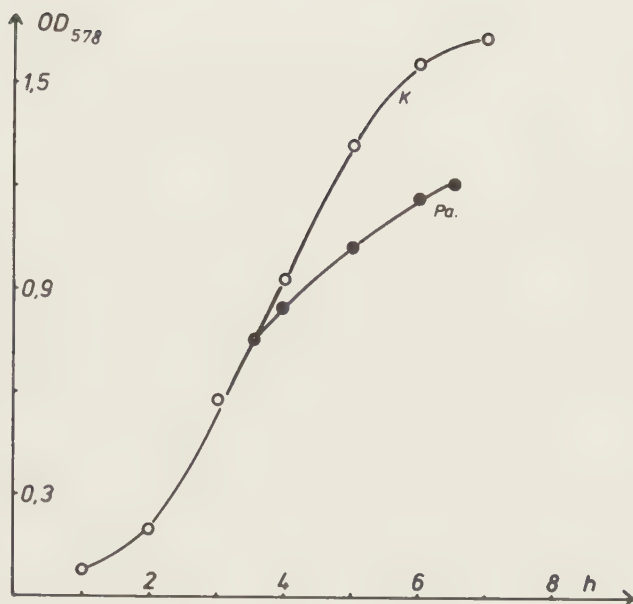


Abbildung 23: Wachstum von *B. subtilis* W 23 in 20 l-Fermenterzuchtungen (Minimal-Nährmedium), aufgezeichnet durch Extinktionsmessung bei 578 nm, $d = 1$ cm.

Das Wachstum der Kontrollkultur verläuft typisch, die Generationszeit beträgt 60 Minuten. Zusatz von Pactamycin zum Nährmedium in der späten logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{578} = 0,7$) bewirkt eine Wachstumshemmung. Die Wirkung des Antibiotikums ist von der Konzentration, bezogen auf die Zellzahl, abhängig. Die Keime werden drei Stunden nach Pactamycinzugabe geerntet, Kontrollen am Beginn der Ruhephase.

-o-o-o- = Kontrollkultur

-●-●-●- 0,25 µg Pactamycin pro ml Medium

Tabelle 8

Methylierbarkeit von *B. subtilis* tRNA in vitro mit Enzym-extrakt aus *B. subtilis*

	pMol / OD _{tRNA}				
Kontrolle	0	0	0	0	0
Pactamycin	16,3	22,4	19,5	20,0	26,0

Reaktionsansatz : Siehe Material und Methoden 2.7.

Reaktionsverlauf : Siehe Abbildung 6

Die Methylierbarkeit von tRNA und ribosomaler RNA aus *B. subtilis* W 23 nach Pactamycinbehandlung wurde untersucht, indem Gesamt-Nucleinsäureextrakte in vitro durch homologe Enzymfraktionen (S-100) mit ¹⁴C-SAM remethyliert und an MAK-Säulen chromatographiert wurden.

- Siehe Abbildung 24 nächste Seite -

Da RNAs aus normal gewachsenen *B. subtilis* mit zellfreien Extrakten des gleichen Organismus nur geringfügig (maximal 1/10 der behandelten Keime) methyliert werden können, ist keine getrennte Kontrollchromatographie zum Diagramm in Abbildung 24 notwendig.

Die Verringerung der 23 S RNA Menge im Vergleich zu den übrigen RNAs (vergleiche Abb. 9 und 24) ist keine Folge der Pactamycinbehandlung, da KERSTEN et al. (1967) durch

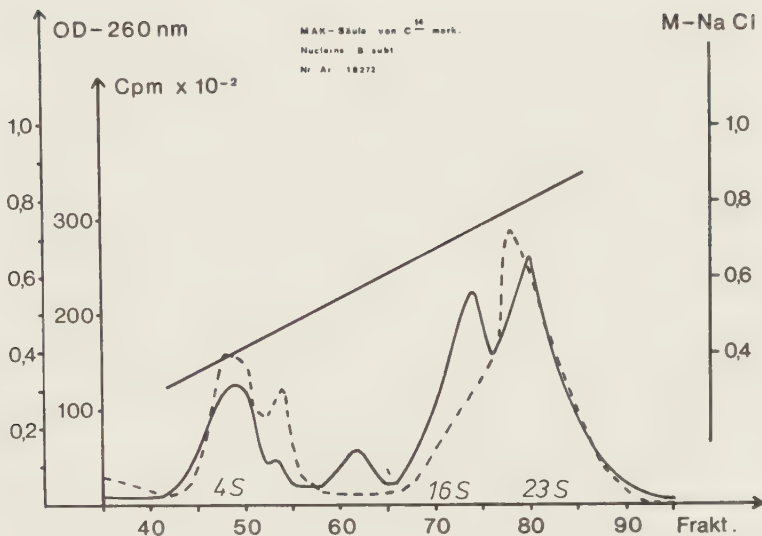


Abbildung 24: MAK-Chromatographie eines Nucleinsäure-extraktes aus *B. subtilis* W 23, gewachsen unter Einwirkung von 0,25 μ g Pactamycin pro 1 ml Medium.

40 OD₂₆₀ untermethylierter Nucleinsäuren wurden "in vitro" mit ^{14}C -Methylgruppen remethyliert. Die aus dem Reaktionsansatz zurückgewonnenen Nucleinsäuren wurden auf die Säule aufgetragen. Zur Messung der Radioaktivität wurden 0,2 ml jeder Fraktion (3ml) im Dioxanzintillator gezählt. Die Konzentration der Nucleinsäuren wurde durch Extinktionsmessung bei 260 nm bestimmt.

————— OD₂₆₀
----- cpm

MAK-Chromatographie zeigen konnten, daß das Mengenverhältnis von 16 S und 23 S RNA in Kontrollkeimen und in mit Pactamycin behandelten *B. subtilis*, gleich bleibt. Vermutlich wird während der zweistündigen Inkubation im Methylaseansatz ribosomale RNA, und zwar bevorzugt 23 S RNA, abgebaut.

Eine Verminderung der 23 S RNA während des Experimentes konnte mehrfach beobachtet werden, sodaß die Reproduktion dieser Analysen äußerst schwierig war.

Die Ermittlung der spezifischen Radioaktivität der einzelnen RNA-Species ergab den jeweiligen Untermethylierungsgrad. Die Methylierung der DNA war wahrscheinlich zu gering, um hier sichtbar zu sein.

- Siehe Tabelle 9 -

Tabelle 9

Verteilung der Radioaktivität ($^{14}\text{CH}_3$) auf die RNA-Fractionen von *B. subtilis* (Pactamycin behandelt) nach Trennung der remethylierten Nucleinsäuren an MAK-Säulen.

RNA	OD ₂₆₀	cpm $\times 10^{-2}$	cpm/OD ₂₆₀
4S	~ 5	~ 2 100	$4,2 \times 10^2$
16S	~ 11	~ 750	$0,7 \times 10^2$
23S	~ 18	~ 6 050	$3,4 \times 10^2$
16S + 23S	29	6 800	$2,3 \times 10^2$

Den Werten der Tabelle ist folgendes zu entnehmen:

1 OD "tRNA" läßt sich unter obigen Bedingungen ungefähr doppelt so gut methylieren wie 1 OD rRNA (16 S + 23 S). Die 16 S RNA nimmt, soweit dies bei der unvollständigen Trennung der beiden ribosomalen RNAs kalkuliert werden kann, nur etwa ein Fünftel an CH_3 Gruppen im Vergleich zur 23 S RNA auf.

Im Vergleich zur "tRNA" (=100%) beträgt die Remethylierung der 23 S RNA 75%.

Die "tRNA" Fraktion könnte mit Abbauprodukten von 23 S rRNA verunreinigt sein.

3.5.1. Methylierung spezifischer Basen der tRNA in B. subtilis während der Pactamycinbehandlung.

Die "Untermethylierung" der tRNA aus B. subtilis nach Behandlung der Zellen mit Pactamycin ist nach den oben beschriebenen Experimenten erwiesen. Hieraus ergibt sich die Frage, ob der Effekt spezifisch auf die Methylierung bestimmter Basen gerichtet ist, oder ob alle Methylierungen der tRNA in gleichem Ausmaß verhindert werden. Zur Lösung dieses Problems wurden zwei Kulturen von B. subtilis W 23 in Parallelansätzen in vivo mit ^{14}C -Methionin über drei Stunden markiert. Die eine Kultur enthielt 0,25 μg Pactamycin pro ml Nährmedium. Nach Isolierung der tRNAs wurde das Muster der methylierten Basen analysiert. Das Ergebnis der Basenanalysen zeigen Abbildungen 25 A und B und Tabelle 10.

Die Zusammensetzung der methylierten Basen des Gesamt-tRNA-Hydrolysates aus Kontrollkeimen und aus mit Antibiotikum gewachsenen Keimen verändert sich im Rahmen der Meßgenauigkeit nicht. Die relativen Mengen bleiben gleich. Daraus läßt sich schließen, daß die Untermethylierung jede Base gleichermaßen betrifft.

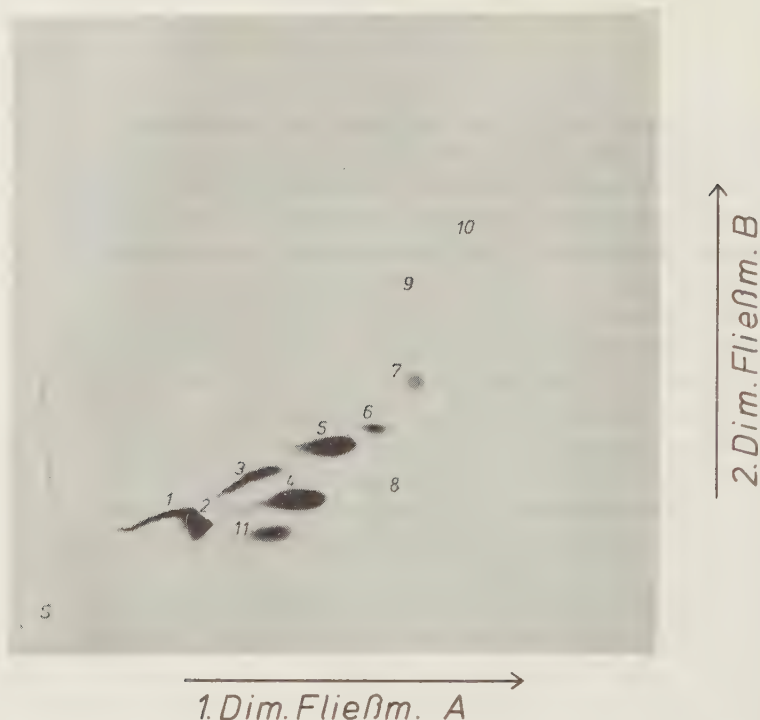


Abbildung 25 A: Autoradiographische Darstellung des Musters der methylierten Basen von *B. subtilis* tRNA, die unter Pactamycineinwirkung gebildet wurde.

Zusammen mit 0,25 µg Pactamycin/ml Medium wurde bei einer $OD_{258} = 0,7$ ^{14}C -Methionin dem Nährmedium zugegeben und über 3 Stunden eingebaut. Die tRNA wurde isoliert, hydrolysiert und chromatographiert wie in 3.2.1. beschrieben. Das erhaltene Basenmuster ist annähernd das gleiche, wie das normaler *B. subtilis* tRNA. Vergleiche Tabelle 10.

1 = 7-Methylguanin; 2 = 1-Methylguanin; 3 = 2-Methylguanin; 4 = 1-Methyladenin; 5 = 2-Methyladenin; 6 = 6-Methyladenin; 7 = 6-Dimethyladenin; 8 = 5-Methylcytosin; 9 = 5-Methyluracil; 10 = 3-Methyluracil (zur photographischen Darstellung war dieser Fleck auf der Autoradiographie zu schwach); 11 = X-nicht identifiziert.

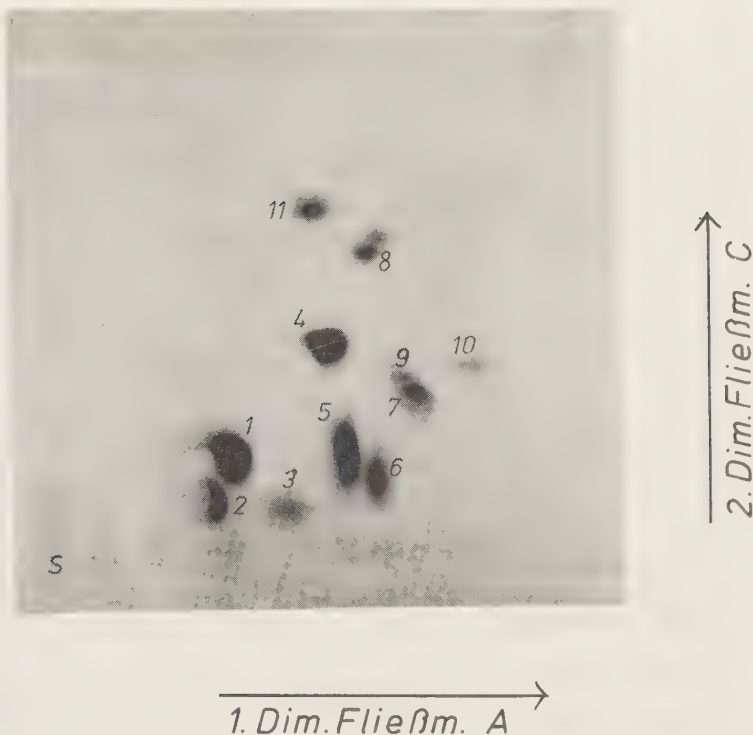


Abbildung 25 B: Autoradiographie des Dünnschichtchromatogrammes des gleichen tRNA-Hydrolysates, das in Abbildung 25 A gezeigt ist.

Zur Trennung von Fleck 1 und 2 wurde hier in der 2. Dimension Fließmittel C (siehe 3.2.1.) benutzt. Alle methylierten Basen sind mit den gleichen Ziffern wie in der Legende zur Abbildung 25 A bezeichnet.

Tabelle 10

Relative Mengen der methylierten Basen in tRNA von normalen *B. subtilis* und Pactamycin behandelten *B. subtilis*, markiert in vivo und in vitro.

Nr.	Verbindung	Prozent der Gesamt-Radioaktivität in Methylgruppen		
		B. subt. Kontrolle in vivo	B. subt. + Pacta. in vivo	B. subt. + Pacta. in vitro
1	7-Methylguanin } 2	43,8	47,0	71,0
	1-Methylguanin }			
3	2-Methylguanin	4,9	4,5	3,6
4	1-Methyladenin	22,8	22,0	<1,0
5	2-Methyladenin	13,0	10,0	3,5
6	6-Methyladenin	4,6	4,4	---
7	6-Dimethyladenin	3,0	2,4	17,5
8	5-Methylcytosin	2,4	1,8	<1,0
9	5-Methyluracil	<1,0	2,9	---
10	3-Methyluracil	---	---	---
11	X-nicht identif.	3,4	4,2	3,7

Bei diesen langzeitmarkierungen ist es nicht möglich, die absolute Untermethylierung zu ermitteln, da die spezifische Radioaktivität in der Kontrolle durch zell-eigene Methioninsynthese nicht konstant gehalten werden kann. Die Frage nach der Basenspezifität des Pactamycineffektes ist nach diesen Experimenten so zu beantworten: Pactamycin erzeugt eine generelle, gleichmäßig auf alle Basen der tRNA verteilte Untermethylierung.

3.5.2. Remethylierung der isolierten tRNA und Analyse der methylierten Basen.

tRNA aus Pactamycin behandelten Keimen wurde isoliert, und mit homologem Enzymextrakt und radioaktivem SAM remethyliert und die markierten Basen untersucht. Das Muster entspricht nicht dem Muster, das die in vivo Markierungen ergaben. Nimmt man an, daß das Ausmaß der Remethylierung dem der Untermethylierung entspricht, würden die bei dem in vitro Experiment erhaltenen Werte eine verschieden starke Beeinflussung der Basenmethylierung durch Pactamycin dokumentieren. Von der Untermethylierung am stärksten betroffen scheinen demnach 1- und 7-Methylguanin sowie 6-Dimethyladenin. Hingegen wären die Basen 6-Methyladenin, 1-Methyladenin und 2-Methyladenin kaum oder überhaupt nicht betroffen. Diese Diskrepanz der "in vivo" und "in vitro" Experimente zeigt, daß die Remethylierbarkeit untermethylierter tRNA zumindest quantitativ nicht das richtige Maß für den Untermethylierungsgrad des Substrates darstellt. Veränderungen der Konformation des Substrates durch die Untermethylierung selbst, könnten andere Methylasen daran hindern sich an die spezifisch zu methylierenden Bereiche der tRNA anzulagern.

- Siehe Abbildung 26 nächste Seite -

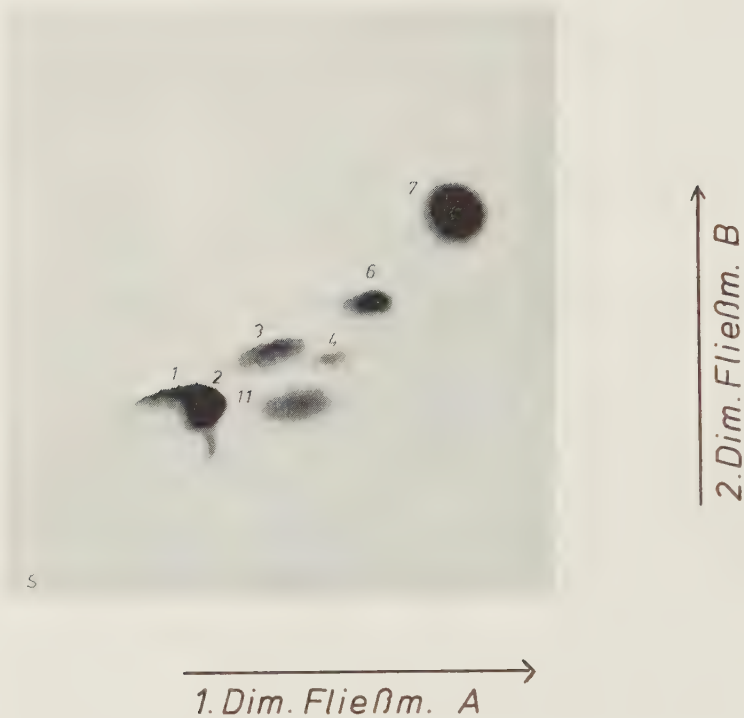


Abbildung 26: Muster der remethylierten Basen von untermethylierter tRNA aus Pactamycin behandelten *B. subtilis*.

Zur *in vitro* Methylierung der isolierten tRNA wurden homologe Enzymextrakte aus *B. subtilis* und ^{14}C -SAM verwendet. Hydrolyse- und Chromatographiebedingungen, siehe 3.2.1. Die relativen Verhältnisse sind der Tabelle 10 zu entnehmen.

1 = 7-Methylguanin; 2 = 1-Methylguanin; 3 = 2-Methylguanin;
4 = 1-Methyladenin; 6 = 6-Methyladenin; 7 = 6-Dimethyladenin;
11 = X-nicht identifiziert.

3.5.3. Übersicht über die Resultate der tRNA-Basenanalysen aus Factamycin behandelten *B. subtilis*.

Alle, in den vorigen Abschnitten beschriebenen Basenmuster der tRNA aus Factamycin behandelten Keimen wurden durch Auskratzen der Substanzflecken aus den Dünnschichtchromatogrammen quantitativ ausgewertet. Zum Vergleich mit dem normalen Muster der methylierten Basen aus *B. subtilis* sind alle Daten in Tabelle 10 zusammengefaßt.

Werden untermethylierte tRNAs oder rRNA aus *E. coli* mit $\text{met}^- \text{rel}^-$ mit Enzymextrakten aus normal gewachsenen *B. subtilis* oder aus mit Factamycin behandelten *B. subt.* in Gegenwart von SAM inkubiert, so zeigen beide Ansätze dieselbe Reaktionskinetik, und es wird das gleiche Endniveau erreicht. Auch der Zusatz von Factamycin zum Methylase-Testansatz in vitro verändert Geschwindigkeit und Ausmaß der Methylierungsreaktion nicht. (H. KERSTEN, pers. Mitteilung) Dies bedeutet, daß es keine Wechselwirkung des Antibiotikums mit den Enzymen gibt, also auch keine selektive Hemmung einzelner Methylasen. Auch diese Resultate sprechen gegen die quantitativen Verhältnisse der remethylierten Basen, die bei der in vitro Reaktion gefunden wurden.

- Siehe Abbildung 27 -

Für die experimentelle Durchführung der Enzymkinetiken danke ich Frau KISCHKA.

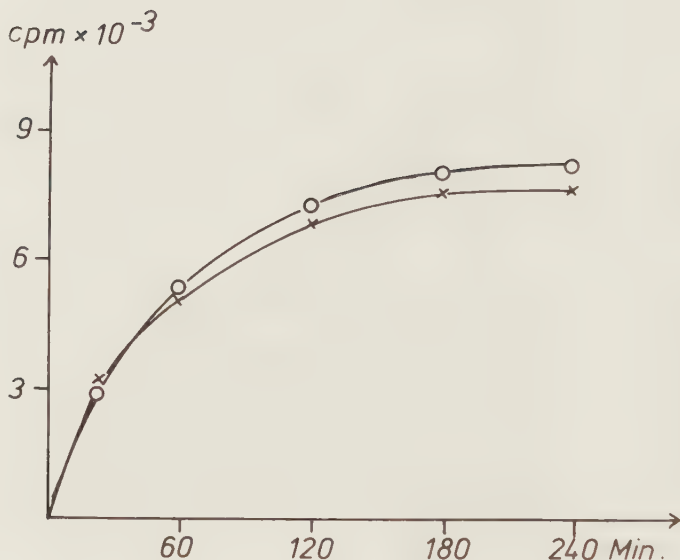


Abbildung 27: Kinetik der Methyltransferasen aus Extrakten von normalen *B. subtilis* W 23 (x-x) und aus Pactamycin behandelten *B. subtilis* (o-o).

Als Substrat wurde untermethylierte tRNA aus methionin-
gehungerten *E. coli* met⁻ rel⁻ verwendet. Der Reaktions-
ansatz (siehe Material und Methoden 2.7.1.) enthält
2 OD₂₆₀ tRNA und Enzymextrakt mit 800 µg Protein.
Reaktionsbedingungen und -Durchführung wie in Material
und Methoden 2.7.1. beschrieben. Die Enzymextrakte aus
Kontrollkeimen und behandelten Keimen (Pactamycin) unter-
scheiden sich weder in ihrer Aktivität noch in ihrer
Kapazität.

3.6. Eigenschaften der tRNAs aus Pactamycin behandelten *B. subtilis*.

Die Experimente mehrerer Arbeitsgruppen (NOVELLI, PETERKOFISKY) zeigen, daß stark untermethylierte tRNA-Species aus *E. coli* met⁻ rel⁻ gegenüber normal methylierten Kontroll-Molekülen auf speziellen Ionenaustauschern ein differierendes chromatographisches Verhalten zeigen und somit untermethylierte von normal methylierter tRNA abgetrennt werden kann. Bei den Versuchen, das chromatographische Verhalten von tRNAs aus behandelten und unbehandelten *B. subtilis* zu untersuchen, wurde Phe-tRNA^{Phe} an BD-Cellulose und im RPC-5 System von KELMERS chromatographiert. Die experimentellen Bedingungen aller Chromatographien sind in Material und Methoden beschrieben. Wurden im Einzelfall einige Parameter modifiziert, ist dies in den Legenden zu den betreffenden Abbildungen angegeben.

3.6.1. Chromatographisches Verhalten.

Die Chromatographie von Phe-tRNA^{Phe} aus *B. subtilis* an BD-Cellulose liefert 3 isoacceptierende Gipfel. Eine unter gleichen Bedingungen durchgeführte Chromatographie von *E. coli* tRNA (ROY et al., 1971) zeigt auch 3 Gipfel, deren Mengen aber in ganz anderem Verhältnis zueinander stehen, als die bei *B. subtilis* gefundenen. Da Elutionsprofile isoacceptierender tRNAs nur dann verglichen werden können, wenn sämtliche Parameter identisch sind, wurden Phe-tRNA^{Phe}_{Kontrolle} mit ¹⁴C-Phe und Phe-tRNA^{Phe}_{Pacta} mit ³H-Phe acyliert und in einem Säulenlauf cochromatographiert.

Wie Abbildung 28 zeigt, konnte kein Unterschied im chromatographischen Verhalten festgestellt werden, obwohl die Untermethylierung der Phe-tRNA^{Phe} wahrschein-

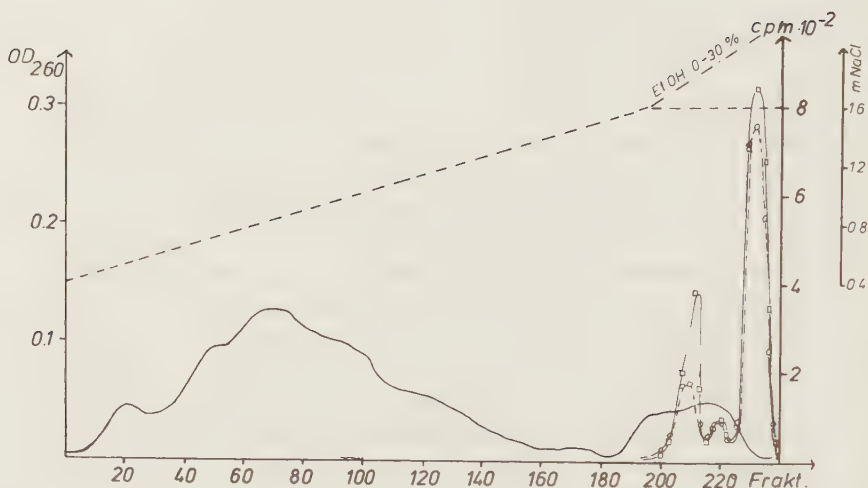


Abbildung 28: Cochromatographie von tRNA aus *B. subtilis* (Kontrolle) und aus Pactamycin behandelten *B. subtilis* an BD-Cellulose.

Je 50 OD₂₆₀ wurden, wie unter 2.6. beschrieben, mit radioaktivem Phenylalanin acyliert, gemeinsam in 3 ml 0,01 m MgAc₂, 0,05 m NaAc, pH = 5,0 und 0,04% NaN₃ (Standardpuffer), sowie 0,4 m NaCl Puffer auf eine 1x80 cm Säule gegeben. Eluiert wurde mit 750 ml eines linearen Kochsalzgradienten (0,4 m - 1,6 m NaCl in Standardpuffer), anschließend mit 450 ml eines Äthanolgradienten (0 - 30% in 1,6 m NaCl und Standardpuffer). Die Kontroll-tRNA war mit ¹⁴C-Phe, die "Pactamycin-tRNA" mit ³H-Phe beladen. Durchflußrate: 19,2 ml/h; Fraktion: 4,8 ml

—	OD ₂₆₀	o-o-o	cpm ¹⁴ C-Phe-tRNA ^{Phe} (Kontrolle)
----	m NaCl	□-□-□	cpm ³ H-Phe-tRNA ^{Phe} (Pactamycin behandelt)
-.-.-	% EtOH		

lich ist, ohne experimentell bewiesen zu sein. Eine Veränderung der quantitativen Verhältnisse der Gipfel zueinander wurde beobachtet, wobei der zuerst eluierte Gipfel meist deutlich erhöht war, wenn die Keime unter Factamycineinfluß gewachsen waren.

Die quantitativen Ergebnisse wurden in getrennten Chromatographien - ohne die Fehlerquellen der Doppelmarkierung - bestätigt.

Da die Chromatographie an BD-Cellulose keine Abtrennung eines besonderen Phe-tRNA-Gipfels aus den Factamycin behandelten Keimen ergab, wurden zur Überprüfung der Ergebnisse weitere Experimente mit der Reversed-Phase-Chromatographie gemacht. Die Trennung in drei Phenylalaninspezifische Gipfel erfolgt hier besser und vollständiger, wobei die Reihenfolge der Gipfel die gleiche zu bleiben scheint. Auch im RPC-5-System konnten keine chromatographischen Differenzen zwischen Phe-tRNA^{Phe}_{Facta} und Phe-tRNA^{Phe}_{Kontrolle}, was die Ablösekonzentration betrifft, festgestellt werden. Die quantitative Verschiebung innerhalb der Gipfel zeigte sich ebenfalls. Der erste Isoacceptor ist mengenmäßig erhöht.

- Siehe Abbildung 29 -

Bei diesen Experimenten wurde ich dankenswerterweise von Herrn Dipl. Chem. R. Raettig unterstützt.

Es läßt sich also in zwei verschiedenen Chromatographie-Systemen kein unterschiedliches Bindungsverhalten der Phe-tRNA^{Phe} oder Facta-Phe-tRNA^{Phe} an speziellen Ionenaustauschern zeigen, aber verschiedene Mengenverhältnisse der einzelnen isoacceptierenden tRNA-Species. Die Verhältnisse der in jedem Gipfel eluierten Radioaktivität in Prozent der gesamten Radioaktivität zeigt Tabelle 11.

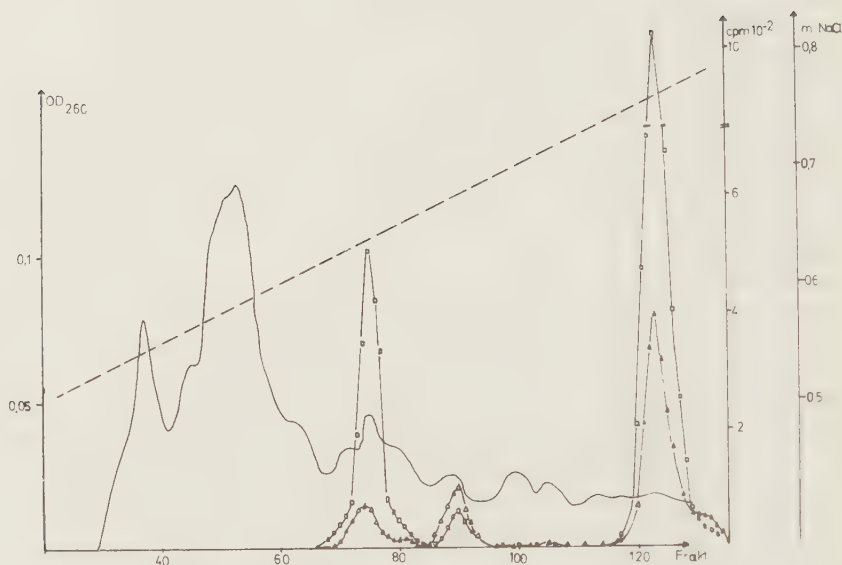


Abbildung 29: Cochromatographie von ^{14}C -Phe-tRNA_{Kontrolle} und ^3H -Phe-tRNA_{Pacta} im RPC-5-System.

Eine 2x45 cm Säule wurde mit je 20 OD₂₆₀ tRNA beschickt, die vorher mit ^{14}C -Phe (Kontrolle) und ^3H -Phe (Pacta) acyliert worden waren. Eluiert wurde mit 2 l eines linearen Kochsalzgradienten von 0,45 bis 1,0 m NaCl in 0,01 m MgAc₂ und 0,01 m NaAc, pH = 5,0 Puffer. Die Durchflußrate betrug 92 ml/h, es wurden Fraktionen von 9,2 ml gesammelt. Die Radioaktivität wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, bestimmt.

———	OD ₂₆₀	-Δ-Δ-	cpm ^{14}C -Phe-tRNA _{Kontrolle} ^{Phe}
-----	m NaCl	-□-□-	cpm ^3H -Phe-tRNA _{Pacta} ^{Phe}

Tabelle 11

RFC-5-Chromatographien von B. subt. tRNA mit ^{14}C -Phe acyliert.

	Kontrolle			Pactamycin		
aufgetragene Radioaktivität	110 000 cpm			115 000 cpm		
Prozent der insgesamt eluierten Radioaktivität	1. Gipfel	2. Gipfel	3. Gipfel	1. Gipfel	2. Gipfel	3. Gipfel
	9%	3%	88%	32%	3%	65%

3.6.2. Acylierbarkeit.

Um nach der biologischen Rolle von Methylgruppen in tRNA-Molekülen zu fragen, wurde die Acceptor-Aktivität der tRNA^{Phe} aus normal gewachsenen B. subtilis mit der Phenylalaninaufnahme einer tRNA aus Pactamycin behandelten Keimen verglichen. Der Reaktionsansatz ist in Material und Methoden beschrieben, ebenfalls die Kinetik dieser Reaktion. Der Vergleich der Endbeladung reiner tRNA-Präparation aus Kontrollkeimen und Pactamycinkeimen konnte keine Unterschiede in der maximalen Aufnahme von Phenylalanin erbringen.

Beide tRNA-Populationen nehmen ungefähr 30 pMol Phenylalanin pro 1 OD₂₆₀ tRNA auf. Dieser Wert entspricht der Phenylalaninaufnahme reiner E. coli tRNA.

Tabelle 12 zeigt die Werte, die in verschiedenen Experimenten erhalten wurden.

- Tabelle 12 siehe nächste Seite -

Tabelle 12

Maximale Beladbarkeit der Gesamt-tRNA aus *B. subtilis* und
 Pactamycin behandelten *B. subtilis* mit ^{14}C -Phenylalanin.

	pMol phe/OD tRNA				
Kontrolle	30	30	29	22	34
Pactamycin	29	27	30	34	34

Experimentelle Bedingungen und Reaktionsverlauf siehe Material
 und Methoden 2.6.

4. Diskussion.

4.1. Basenanalyse.

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel: Erstens die methylierten Basen in bakteriellen Ribonucleinsäuren zu analysieren und zweitens den Einfluß des Protein-synthesehemmstoffes auf die Modifikation von Ribonucleinsäuren durch spezifische tRNA Methyltransferasen zu studieren.

Hierzu wurde, gestützt auf verschiedene Angaben der Literatur, ein Verfahren der Basenanalyse ausgearbeitet, das es ermöglicht, quantitative Aussagen über die methylierten Basen in tRNA aus *B. subtilis* W 23 und *E. coli* MRE 600 zu machen. Die Auswahl der geeigneten Methode wurde in Kapitel 3.1.3. begründet und die Vorteile gegenüber anderen Methoden dargelegt. Eine Abschätzung für die Genauigkeit des Verfahrens läßt sich auf Grund folgender Annahmen durchführen. Die tRNAs aus *E. coli* enthalten (HAYASHI et al., 1966) im Durchschnitt 2,3 methylierte Basen pro Molekül. Man nimmt an, daß in jedem tRNA-Molekül die Base 5-Methyluracil einmal vorkommt. Daraus läßt sich errechnen, daß 5-Methyluracil 43,5% der methylierten Basen ausmacht. Die gefundenen Werte für 5-Methyluracil (44%) stimmen mit dem berechneten Wert sehr gut überein. Dennoch muß mit Fehlern gerechnet werden, da auf Grund der leichten Degradation der rRNA Verunreinigung der tRNA durch rRNA-Fragmente nicht ausgeschlossen werden können.

Das beschriebene Verfahren der Basenanalyse kann bei der Isolierung der RNA Methyltransferasen aus Bakterien oder Eucaryoten zur Spezifitätsbestimmung der Enzyme und somit als geeigneter Suchtest Verwendung finden.

4.2. Vergleich der Muster der methylierten Basen von *E. coli* und *B. subtilis*.

Durch die Fortschritte in den Techniken der tRNA-Reinigung und -Sequenzierung sind die Positionen vieler modifizierter Basen in der Primärstruktur der tRNAs bekannt. Die modifizierten Basen finden sich vorwiegend in den sogenannten "loops" (siehe Abb. 1 und 2 dieser Arbeit) (D. SÖLL, 1971). Die Sequenzanalysen verschiedener tRNAs aus *E. coli* zeigen Homologien bestimmter Abschnitte der Primärstruktur (ZACHAU, 1969). So wurde bisher in allen analysierten tRNAs aus *E. coli*, aber auch aus höheren Organismen wie Hefe oder anderen Eucaryoten, eine Penta-nucleotidsequenz GTΨCG(A) mit zwei modifizierten Basen gefunden (KERR und BOREK, 1972; ZAMIR et al., 1965; SANGER et al., 1965). (A) bedeutet, daß in seltenen Fällen das terminale G dieser Sequenz durch A ersetzt ist. Das Ribothymidin innerhalb dieser Sequenz nimmt immer die Position 23 vom Acceptorende der tRNA ein. Ausnahme zu diesem Prinzip bilden nach bisheriger Kenntnis die Initiations-tRNAs höherer Organismen (PIPER und CLARK, 1973; SIMSEK et al., 1973; PETRISSANT, 1973), tRNAs aus *Mycoplasma* (JOHNSON et al., 1970) und die tRNA^{Gly}, die an der Zellwandbiosynthese beteiligt ist (STROMINGER et al., 1971).

Durch Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen (SHIMIZU et al., 1970; OFENGAND und HENES, 1969; HENES et al., 1969) konnte gezeigt werden, daß die Sequenz GTΨCG an der messenger-RNA abhängigen Bindung der tRNA an die Ribosomen beteiligt ist. Auf Grund dieser Resultate wurde angenommen, daß GTΨCG eine gemeinsame Sequenz der meisten tRNAs, selbst verschiedener Organismen, darstellt. Wenn diese Annahme zuträfe, so sollte die relative Häufigkeit von Ribothymidin in den tRNA-Populationen verschiedener Bakterienstämme nicht sehr verschieden sein.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zeigen, daß die Basenmuster in *E. coli* und *B. subtilis* tRNA stark voneinander abweichen. Während die methylierten Guanine in annähernd gleichen Mengen in beiden Organismen vorhanden sind, unterscheiden sich die methylierten Adenine qualitativ und quantitativ. So macht in *B. subtilis* tRNA 1-Methyladenin ca. 1/5 aller methylierten Basen aus, während es in *E. coli* tRNA überhaupt nicht existiert. Ribothymidin (5-Methyluracil) kommt in *B. subtilis* tRNA nur in sehr geringen Mengen vor. In *E. coli* tRNA entfallen ungefähr 40% aller methylierten Basen auf dieses methylierte Uracil. Von den zwei unidentifizierten methylierten Basen in *E. coli* tRNA kommt die eine auch in *B. subtilis* tRNA vor.

Aus den Resultaten der Basenanalyse muß geschlossen werden, daß die meisten tRNAs aus *B. subtilis* W 23 kein Ribothymidin in Position 23 vom 3' Ende her besitzen. Weiter läßt sich folgern, daß die Sequenz GTΨCG zumindest in einer Base verändert ist und somit das zum allgemeinen Prinzip erhobene Strukturmerkmal für *B. subtilis* tRNA nicht gilt.

Die Ergebnisse zeigen weiterhin, daß die Sequenz GTΨCG nicht unbedingt erforderlich ist, um die Bindung der tRNA ans Ribosom zu ermöglichen, da in *B. subtilis* eine intakte Proteinsynthese abläuft. Dies wird durch Resultate von BJORK und ISAKSSON (1970) unterstützt, die als einzig lebensfähige Methyltransferase minus Mutante von *E. coli* den Stamm erhielten, dem die 5-Methyluraciltransferase fehlt. D. SÖLL und Mitarbeiter haben ebenfalls eine tRNA aus *Mycoplasma* isoliert, die kein 5-Methyluracil besitzt, jedoch in der Proteinsynthese aktiv ist. Eine Veränderung der kinetischen Parameter der Aminoacylierung oder der Polypeptidbildung durch die Modifikation von Uracil in Position 23 kann dennoch nicht ausgeschlossen werden.

1-Methyladenin, das bisher nur in Hefe und anderen eucaryotischen tRNAs in Position 19 vom 3' Ende her also neben CG in der GTΨCG Sequenz gefunden wurde (KEITH et al., 1973) ist auch Bestandteil einiger *B. subtilis* tRNAs. Es ist daher möglich, daß während der Evolution der procaryotischen tRNAs eine gemeinsame Sequenz GUΨCGA entweder durch Methylierung von Uracil in Position 23 oder durch Methylierung von Adenin in Position 19 modifiziert wurde und erst in höheren Entwicklungsstufen der Organismen beide Möglichkeiten verwirklicht sind. Mit dieser Vorstellung stimmen auch die Ergebnisse von KLAGSBRUNN (1973) überein, der in tRNAs grampositiver Bakterien (*M. lysodeikticus* und *B. subtilis*) größere Mengen von 1-Methyladenin findet, während 5-Methyluracil in diesen Bakterien fehlt oder nur in sehr geringen Mengen vorhanden ist.

Daß das Fehlen von 5-Methyluracil oder von 1-Methyladenin in tRNAs auf die Abwesenheit der zugehörigen Enzymaktivitäten zurückgeführt werden muß und nicht auf Veränderungen der tRNA-Sequenz oder ihrer Sekundär- bzw. Tertiärstruktur beruht, wurde in dieser Arbeit durch in vitro Methylierungen von *E. coli* bzw. *B. subtilis* tRNAs jeweils mit den heterologen Enzymextrakten gezeigt.

B. subtilis-Enzyme sind nicht in der Lage in einer untermethylierten tRNA aus *E. coli* Uracil in Position 23 zu 5-Methyluracil zu methylieren. Sie synthetisieren aber alle Basen auch 1-Methyladenin in homologem Substrat. Umgekehrt können Enzyme, die aus *E. coli* extrahiert wurden in einer untermethylierten tRNA aus *B. subtilis* alle Arten von Basen methylieren, die in *E. coli* tRNAs vorkommen, jedoch nicht Adenin zu 1-Methyladenin. Bei der heterologen Methylierung werden Methylierungsmuster erhalten, die dem nativen tRNA-Basenummuster der Keime gleichen aus denen die Enzyme stammen.

BAGULEY und STAEHELIN (1970) haben gezeigt, daß die 1-Methyladenintransferase aus Rattenleber, Adenin in tRNAs aus Hefe in denselben Nucleotidsequenzen methyliert, wie in homologer tRNA aus Rattenleber. Ebenso haben KUSCHINO und NISHIMURA (1970) eine spezifische Sequenz- und tRNA-Erkennung der Methyltransferasen experimentell bewiesen. Diese Befunde sprechen dafür, daß Methyltransferasen bestimmte Stellen in der Primärstruktur der tRNA methylieren. Aus den Resultaten dieser Arbeit läßt sich daher schließen, daß in tRNAs von *E. coli* und *B. subtilis* homologe Sequenzen existieren. Das bedeutet, daß die Stelle in *B. subtilis* tRNAs, in der *E. coli* Enzyme Uracil zu 5-Methyluracil methylieren die Sequenz GUΨCG sein könnte.

Es wurde vermutet, daß zumindest einige modifizierte Basen den tRNAs eine erhöhte Spezifität für Wechselwirkungen mit Aminoacylsynthetasen oder anderen Enzymen, die bei der Peptidbildung in der Zelle beteiligt sind, verleihen.

Neben den Substraten von SÖLL (1969), KHORANA (1970) und STROMINGER (1968), die alle individuelle methylgruppenfreie tRNAs in Händen haben, stellt die hier beschriebene Möglichkeit, wechselseitig Methylgruppen in definierte Bereiche reiner spezifischer tRNAs einzuführen, ein experimentelles System dar, weitere Erkenntnisse über die Funktion der Methylgruppen in tRNAs und über die Erkennungsbereiche der Methyltransferasen zu erbringen.

Sicher zeigen die Ergebnisse, daß Methylierungen in heterologen Systemen nicht zufällig geschehen, sondern die Enzyme eine Spezifität für Basen und Sequenzen, vielleicht sogar für spezifische tRNAs (BJORK und SVENSSON, 1969; SVENSSON et al., 1969) besitzen.

4.3. Charakterisierung untermethylierter RNA aus Pactamycin behandelten *B. subtilis*.

Chloramphenicol war der erste Hemmstoff der Proteinbiosynthese, von dem gezeigt werden konnte, daß er in vitro und in vivo an Ribosomen bindet (VASQUEZ 1964, WOLFE und HAHN, 1965). Seither wurden noch weitere Antibiotika gefunden, die nach ihrer Bindung an 70 S- oder 70 S und 80 S Ribosomen klassifiziert werden können (VASQUEZ et al., 1969). Pactamycin gehört zur letzteren Kategorie. COHEN et al. (1969) und VASQUEZ et al. (1969) haben eine spezifische Bindung dieses Antibiotikums an die 30 S Untereinheit bakterieller Ribosomen nachgewiesen.

Methylierte Basen kommen sowohl in tRNAs als auch in rRNAs vor. Die 16 S RNA enthält ungefähr 20% mehr Methylgruppen, als die 23 S RNA (STARR, 1963; SVENSSON et al., 1963). Isolierte rRNA aus *E. coli* Zellen, die mit Chloramphenicol behandelt wurden, enthält weniger Methylgruppen als rRNA aus unbehandelten *E. coli* (DUBIN, 1964; DUBIN und GRUNALP, 1967). Das Ausmaß der Methylierung in 16 S und 23 S RNA, die unter Chloramphenicolwirkung gebildet wurden, beträgt nur 12 % bzw. 56 % der normalen Methylierung (HAYASHI et al., 1966). Die tRNA ist annähernd normal methyliert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß alle RNA-Species aus Pactamycin behandelten Keimen in vitro remethyliert werden können. Dabei lassen sich in isolierte tRNA doppelt soviel Methylgruppen einführen, wie in rRNA. Innerhalb der rRNA entfallen 1/5 der nachträglich eingebauten Methylgruppen auf 16 S und 4/5 auf die 23 S RNA.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse, die durch MAK-Chromatographie remethylierter Gesamt-RNA aus Pacta-

mycin behandelten *B. subtilis* erhalten wurden, bestätigen die Resultate früherer Experimente. KERSTEN et al., (1968) haben bei der in vitro Remethylierung getrennt präparierter RNA-Species gleiche Einbau-Ergebnisse erhalten, ohne jedoch die Anteile innerhalb der rRNA, die auf 16 S und 23 S RNA entfallen, zu trennen.

Erstaunlich ist die erhöhte Methylgruppenaufnahme der 23 S RNA gegenüber der 16 S RNA, wenn die Bakterien mit Pactamycin behandelt wurden, während aus Chloramphenicol behandelten Zellen vorzugsweise untermethylierte 16 S RNA isoliert wurde.

Unter Berücksichtigung des nativen Methylgruppenverhältnisses von 16 S und 23 S RNA, spricht dieser Befund für eine bevorzugte Hemmung der Methylierung der 23 S RNA durch Pactamycin.

Die vollständige Methylierung der rRNA könnte ein wichtiger Schritt in der Reifung der Ribosomen sein, oder wichtig für die Aufrechterhaltung einer intakten Ribosomenstruktur (OSAWA et al., 1969). Wenn 70 S Ribosomen aus Pactamycin behandelten Bakterien isoliert werden, zeigen sie in einem zellfreien Proteinbiosynthesesystem mit Poly-U als mRNA eine verminderte Aktivität in der Bildung von Polyphenylalanin (KERSTEN et al., 1968). Dasselbe konnte BHUYAN (1967) in tierischen Systemen zeigen. Es ist denkbar, daß wegen der Hemmung der Methylierung von 23 S RNA durch Pactamycin die vollständige Reifung der Ribosomen verhindert ist.

Seit der Entdeckung methylgruppenarmer tRNA in Methionin-Mangel Mutanten von *E. coli* wurden die biologischen Eigenschaften dieser tRNAs von mehreren Arbeitsgruppen in verschiedenen in vitro Systemen getestet. SHUGART et al. (1968) konnten zeigen, daß methylgruppenfreie

tRNA in beträchtlich niedrigerer Rate Aminosäuren acceptieren als normale tRNAs.

In drei verschiedenen Fällen konnte gezeigt werden, daß tRNAs, denen die Modifikation neben dem Anticodon fehlt, zwar die richtige Aminosäure in normalem Ausmaß acceptieren, aber unfähig sind, diese zum Ribosom zu transferrieren. GEFTER und RUSSEL (1968) zeigten bei Phagen induzierter tRNA^{Tyr}, der 2-thiomethyl-6-isopentenyl-Adenin neben dem Anticodon fehlt, daß diese tRNA unfähig ist an Ribosomen zu binden. THIEBE und ZACHAU (1968) eliminierten die Base „Y“ neben dem Anticodon der tRNA^{Phe} aus Hefe durch milde Säurebehandlung mit dem Ergebnis, daß auch diese tRNA sich nicht mehr an Ribosomen bindet. FITTLER und HALL (1966) oxidierten den Isopentenyl-Rest der Base neben dem Anticodon mit Permanganat. Die tRNA ließ sich normal mit ihrer Aminosäure beladen, aber die Ribosomen-Bindungsfunktion der tRNA ging verloren. Aus den Experimenten kann geschlossen werden, daß jede Modifikation neben dem Anticodon wichtig ist für die Anheftung der tRNA an Ribosomen.

CAPRA und PETERKOFKY (1968) haben gezeigt, daß untermethylierte tRNAs eine veränderte Codonerkennung haben. Allerdings bleiben diese Befunde nicht unwidersprochen. Es sind danach bisher mindestens drei Funktionen der Modifikationen der tRNA experimentell aufgezeigt worden.

Die Acceptoraktivitäten der tRNAs für Aminosäuren aus normalen und Pactamycin behandelten *B. subtilis* wurden in früheren Experimenten für Phenylalanin, Lysin, Alanin und Valin gemessen. Die Beladbarkeit der tRNAs aus behandelten Kulturen war für Lysin, Alanin und Valin unverändert, während Phenylalanin nur 70% im Vergleich zur Kontrolle acceptiert wurde (KERSTEN et al., 1968).

Die Aktivität der verschiedenen tRNAs in einem zell-freien Proteinbiosynthesystem wurde für mehrere Aminosäuren mit synthetischen Polynucleotiden als messenger-RNA gemessen. Bei der Verwendung von tRNAs aus Pactamycin behandelten Zellen war der Einbau von Leucin um 30% erhöht, der Einbau von Phenylalanin um 30% erniedrigt. Alle anderen untersuchten tRNAs zeigten keine Abweichung von den Kontrollen.

Die Verringerung des Phenylalanineinbaues kann durch die verminderte Beladbarkeit der Phenylalanin-tRNA erklärt werden. Für Leucin-tRNA aus Pactamycinkeimen konnte gezeigt werden, daß die Codonerkennung verändert ist. Die erhöhte Einbaurrate von Leucin in Peptide konnte nur für Poly-UC, nicht für Poly-UG, als messenger-RNA beobachtet werden.

Auch REVEL und LITTAUER (1966) und CAPRA und PETERKOPSKY (1968) berichten für Phenylalanyl-tRNA bzw. für Leucyl-tRNA den Einfluß einer korrekten Methylierung der tRNA auf die Codonerkennung.

Die unterschiedliche Beeinflussung der biologischen Funktionen der verschiedenen tRNA-Species nach Pactamycinbehandlung ergab die Frage, ob alle tRNA-Species von der Untermethylierung betroffen werden und wenn ja ob sich verschiedene tRNA-Species im Ausmaß der Untermethylierung unterscheiden?

Die Resultate geben hierauf folgende Antwort: Pactamycin bewirkt, wie das in vivo Experiment der radioaktiven Markierung zeigt, eine Untermethylierung aller methylierten Basen der tRNAs im gleichen Maße. Das bedeutet, daß alle methylierten Basen um den gleichen Prozentsatz ihres ursprünglichen Vorkommens vermindert auftreten.

Die quantitativen Ergebnisse der Remethylierung isolierter untermethylierter tRNA weichen von den Resultaten

der in vivo Analysen ab. Während sich 1- und 7-Methylguanin und 6-Dimethyladenin erheblich nachmethylieren lassen, finden sich kaum 6-Methyladenin und 1-Methyladenin. Experimente von KLAGSBRUNN (1972) mit Methylase-Extrakten aus SV 40 transformierten Mäusezellen zeigen, daß die Methylierungsmuster in vivo und in vitro verschieden sein können. Es wird diskutiert, daß fehlende Modifikationen des Substrates die weitere Methylierung verhindern oder die Spezifität der Methyltransferasen verändern, da es sequentielle Modifikationen der tRNAs gibt, in denen jeder folgende Schritt vom vorherigen zwingend abhängt (MANDEL und BOREK, 1963; GEFTER, 1969). Dieses wird mit dem Einfluß von Methylgruppen auf die Konformation der tRNA erklärt (BOREK und CHRISTMAN, 1965; PILLINGER et al., 1969). Weiterhin können bei der Remethylierung in vitro die Bedingungen nicht für alle Methyltransferasen optimal sein. Das relative Vorkommen von methylierten Basen in tRNAs aus unbehandelten und mit Pactamycin behandelten *B. subtilis* läßt sich am besten durch radioaktive Markierung mit $^{14}\text{CH}_3$ -Gruppen in vivo feststellen. Die Einbauversuche mit radioaktivem Methionin in wachsenden Keimen können quantitativ falsche Resultate geben, wenn der intrazelluläre "Pool" an Methionin so hoch ist, daß sich die spezifische Aktivität des zugegebenen Methionins durch Verdünnung mit dem zelleigenen Methionin verändert.

WATERS (1969) konnte für Leucyl- und Phenylalanyl-tRNA aus Chloramphenicol behandelten *E. coli* ein verändertes chromatographisches Verhalten auf einer RPC-2-Säule nachweisen. SHUGART et al., (1968) und BIEZUNSKI et al., (1970) zeigten ein verändertes Bindungsverhalten einer Phenylalanyl-tRNA aus methioningehungerten *E. coli* met⁻ rel⁻ an das Austauschermaterial einer RPC-Säule und einer MASA-Säule. Alle Autoren interpretieren ihre Ergebnisse als Anzeichen einer veränderten Struktur der tRNAs.

Bei der Untersuchung des chromatographischen Verhaltens bestimmter tRNA-Species wurde von folgender Überlegung ausgegangen. Wenn sich die tRNAs, die nach Factamycin-zugabe synthetisiert werden, von den normal synthetisierten tRNAs unterscheiden, könnte man eine Veränderung im chromatographischen Verhalten der tRNAs erwarten. Phenylalanyl-tRNA wurde zur Chromatographie ausgewählt, weil von dieser tRNA bereits eine verminderte Acylierbarkeit beschrieben worden war (KERSTEN et al., 1968). Die Cochromatographien von normaler tRNA (^{14}C -Phenylalanin beladen) und Factamycin tRNA (^3H -Phenylalanin beladen) wurden in zwei verschiedenen Systemen, a) an BD-Cellulose und b) mit dem RPC-5-System durchgeführt. Die BD-Cellulose-Chromatographie zeigt Unterschiede in der Primärstruktur von tRNAs an, während das RPC-System auch Konformationsänderungen der tRNAs sichtbar machen soll (MARKER, persönliche Mitteilung).

Normalerweise finden sich für Phe-tRNA^{Phe} von *B. subtilis* zwei Hauptgipfel und geringe Mengen einer dritten Fraktion von Phe-tRNA^{Phe}. Die Lage der Isoacceptoren für Phe-tRNA^{Phe} aus mit Factamycin behandelten Zellen war gegenüber der Kontroll-tRNA unverändert. Allerdings enthielt die tRNA aus behandelten Zellen relativ mehr Material der ersten Fraktion.

Es kann nicht mit Sicherheit entschieden werden, ob es sich hierbei um die Anreicherung einer untermethylierten Phe-tRNA^{Phe} handelt, oder ob eine tRNA ganz anderer Struktur den Anstieg des ersten Gipfels bewirkt. Fraglich ist, ob sich das Fehlen einer Methylgruppe überhaupt so stark auf die Konformation der tRNA auswirkt, daß daraus ein sichtbar verändertes chromatographisches Verhalten resultiert. Endgültige Aussagen können erst gemacht werden, wenn es gelingt reine spezifische

tRNA-Isoacceptoren in vitro nachzumethylieren und die methylierten Basen zu analysieren. Diese Experimente wurden zunächst wegen der geringen Ausbeuten an reiner spezifischer tRNA zurückgestellt.

4.4. Acylierbarkeit untermethylierter tRNA.

Die maximale Beladbarkeit der Phe-tRNA in der Gesamtpopulation der tRNAs war bei tRNA aus *B. subtilis* und aus Pactamycin behandelten Keimen gleich hoch. Mit Ausnahme einer Kontrolle (22 pMol) lagen alle übrigen gefundenen Werte bei ca. 30 pMol Phenylalanin pro 1 OD₂₆₀ Gesamt-tRNA.

Vorausgesetzt, die in dieser Arbeit verwendeten Phe-tRNA-Species (innerhalb der Gesamt-tRNA) aus Pactamycin behandelten *B. subtilis* sind untermethyliert, zeigen die Ergebnisse, daß die Acylierbarkeit der tRNA nicht von der Methylierung beeinflußt wird. Dieser Befund steht in guter Übereinstimmung mit Literaturhinweisen von FETER-KOFSKY (1964), LITTAUER (1964) und BIEZUNSKI (1970).

Der Mechanismus, der zur Bildung untermethylierter tRNA führt, kann wie folgt diskutiert werden:

Pactamycin hemmt in vitro die heterologe Methylierung untermethylierter tRNA aus *E. coli* mit Enzymextrakten aus normalen *B. subtilis* nicht. Das Antibiotikum scheint weder mit den Enzymen noch mit dem Substrat direkt in Wechselwirkung zu treten. Sicher ist, daß die Synthese der RNA und die nachfolgende Methylierung entkoppelt werden. Es ist wahrscheinlich, daß dies durch die verminderte Synthese von RNA-Methyltransferasen bei gleichzeitig gesteigerter Syntheserate von RNA geschieht.

Wird in einer enzymatisch katalysierten Reaktion die Menge des Substrates im Verhältnis zur Enzymmenge auf das Doppelte gesteigert, so wird die Geschwindigkeit der Reaktion erhöht, wobei aber eine geringere, als die doppelte Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird. (MICHAELIS-MENTEN-KINETIK). In gleichen Zeitabschnitten wird bei doppelter Substratmenge ein Teil des Substrates also nicht umgesetzt werden. Der nicht umgesetzte Teil des Substrates wird umso größer sein, je größer das Verhältnis Substrat zu Enzym wird.

So könnte bei Hemmung der Proteinsynthese und Steigerung der RNA-Syntheserate ein Teil der neu synthetisierten RNAs nicht methyliert werden.

5. Zusammenfassung.

Die methylierten Basen der tRNAs aus verschiedenen Mikroorganismen wurden qualitativ und quantitativ analysiert.

Der Einfluß von Factamycin, einem Hemmstoff der Proteinbiosynthese auf die Methylierung von Ribonucleinsäuren in *Bacillus subtilis*, wurde untersucht.

Zur Analyse der methylierten Basen in Ribonucleinsäuren aus Mikroorganismen, wurde, auf Literaturmethoden gestützt, ein geeignetes Chromatographie-Verfahren erarbeitet, um quantitative Resultate zu erhalten.

Die Muster der methylierten Basen der tRNA aus *B. subt.* W 23, *E. coli* MRE 600 und *B. subtilis* $\text{met}^- \text{rel}^+$ wurden miteinander verglichen. Alle drei Keime zeigen verschiedene Zusammensetzung der methylierten Basen der Gesamt-tRNA. Neben geringen Verschiebungen in den quantitativen Verhältnissen fast aller methylierten Basen, unterscheiden sich *E. coli* MRE 600 und *B. subtilis* durch das Auftreten von 5-Methyluracil - 40% in *E. coli* tRNAs - und das Auftreten von 1-Methyladenin - 20% in *B. subtilis* tRNAs. Die Zusammensetzung der methylierten Basen der tRNA aus *B. subtilis* met^- gleicht der des Wildtyps mit Ausnahme des 6-Dimethyladenins, das in den tRNAs dieser Mutante fehlt.

Die Enzymextrakte von *E. coli* MRE 600 und *B. subtilis* W 23 können in der jeweils heterologen untermethylierten tRNA *in vitro* die Basen methylieren, die dem Keim im nativen Basenmuster fehlen. Die bei der heterologen *in vitro* Remethylierung entstehenden Basenmuster ähneln stark den Mustern, die man bei der tRNA-Basenanalyse der Keime erhält, aus denen die Enzyme stammen.

Das Basenmuster der "rRNA" aus *B. subtilis* W 23 wurde mit der gleichen Methode erstellt.

Um den Einfluß von Pactamycin auf die Methylierung der Ribonucleinsäuren aus *B. subtilis* W 23 zu untersuchen, wurde die isolierte RNA aus behandelten Keimen isoliert und in vitro mit homologem Enzymextrakt remethyliert. Die Trennung der RNA-Species durch MAK-Chromatographie ergab Untermethylierung der tRNA und der rRNA, wobei die tRNA ungefähr doppelt soviel Methylgruppen acceptierte, wie die Gesamt-rRNA. Die 16 S RNA nahm im Vergleich zur 23 S RNA (= 100%) bei der Remethylierung nur 20% Methylgruppen auf.

Die Spezifität des Pactamycineffektes auf die Methylierung der Basen der tRNA wurde durch direkte Markierung der Methylgruppen in vivo und durch Remethylierung der nicht methylierten Basen in vitro untersucht. Aus den Markierungsexperimenten in vivo läßt sich schließen, daß von der Untermethylierung alle Basen betroffen werden. Hieraus folgt, daß wenn nicht alle, so doch zumindest die meisten tRNA-Species untermethyliert sind. Daß bei der Remethylierung der untermethylierten tRNAs nicht alle Methylgruppen eingebaut werden können, läßt sich am besten damit erklären, daß die Modifikation in der Zelle sequentiell verläuft.

Zur Untersuchung der Eigenschaften der Phe-tRNA^{Phe} aus Pactamycin behandelten Keimen wurden diese auf BD-Cellulose und im RPC-5-Chromatographie-System nach KELMERS chromatographiert.

Im Vergleich zur Kontrolle war nur das Mengenverhältnis der für Phe-tRNA^{Phe} auftretenden "Isoacceptoren" verändert, nicht aber ihr chromatographisches Verhalten. In wechselndem Ausmaß war die Menge des ersten Isoacceptors der Phe-tRNA^{Phe} vermehrt.

Die maximale Beladbarkeit der Phe-tRNA mit Phenylalanin in der Gesamt-Population der tRNAs wird durch Pactamycinbehandlung der Keime *B. subtilis* W 23 nicht verändert.

Literaturverzeichnis

- 1) Agarwal, K. L. et al. (1970)
Nature, 227, 27
- 2) Arber, W. und S. Linn (1969)
Ann. Res. Biochem. 38, 467
- 3) Augusti-Tocco, G. C. Carestia, F. Grippo, E. Parisi
und E. Scarano (1968)
Biochim. Biophys. Acta 155, 8
- 4) Avital, S. und D. Elson (1969)
Biochim. Biophys. Acta, 179, 297
- 5) Baguley, B. C. und M. Staehelin (1970)
Biochemistry 9, 1645
- 6) Bank, A., S. Gee, A. Mehler, A. Peterkofsky (1964)
Biochemistry 3, 1406
- 7) Baoley, (1967)
Techn. und Prot. Chem.
- 8) Bhuyan, B. K. (1967)
Biochem. Pharmacol. 16, 1411
- 9) Biezunski, N., D. Givon, U. Z. Littauer (1970)
Biochim. Biophys. Acta, 199, 382
- 10) Bjork, G. R. und I. Svensson (1967)
Biochim. Biophys. Acta, 138, 430
- 11) Bjork, G. R. und I. Svensson (1969)
Europ. J. Biochem. 9, 207

- 12) Bjork, G. R. und L. A. Isaksson (1970)
J. Mol. Biol. 51, 83
- 13) Bock, R. M. (1967)
Methods in Enzymology Vol XII. part A (Academic
Press, New York) p. 224
- 14) Borek, E. und M. Christmann (1965)
Fed. Proc. 24, 292
- 15) Bray, G. A. (1960)
Anal. Biochem. 1, 279
- 16) Brownlee, G. G. (1972)
Determ. of Sequences in RNA (North-Holland
Publishing Company, American Elsevier Publishing
Co. Inc., New York) p. 254
- 17) Capra, I. D. und A. Peterkofsky (1968)
J. Mol. Biol. 28, 139
- 18) Cohen, L. B., A. E. Herner und I. H. Goldberg (1969 a)
Biochemistry 8, 1327
- 19) Cohen, L. B. et al. (1969 b)
Biochemistry 8, 1312
- 20) Colombo, B., L. Felicetti und C. Baglioni (1966)
Biochim. Biophys. Acta 119, 109
- 21) Comb, D. G. et al. (1967)
J. Mol. Biol. 25, 317
- 22) Corte, G., D. Schlessinger, D. Longo und P. Venkov (1971)
J. Mol. Biol. 60, 325

- 23) Crick, F. (1958)
Cold Spring Harbor Sym. Quant. Biol. 12, 138
- 24) Dingman, C. W. und A. C. Peacock (1968)
Biochemistry 7, 659
- 25) Dubin, D. T. und A. T. Elkort (1964)
J. Mol. Biol. 10, 508
- 26) Dubin, D. T. und A. Grunalp (1967)
Biochim. Biophys. Acta 134, 106
- 27) Dunn, D. B., I. D. Smith und M. V. Simpson (1960)
Biochem. J. 76, 24 F
- 28) Dunn, D. B. (1963)
Biochem. J. 86, 14 F
- 29) Dunn, D. B. und I. H. Flack (1967)
Phytochem. 6, 459
- 30) Feldmann, H. und H. Falter (1971)
Europ. J. Biochem. 18, 573
- 31) Fellner, P. et al. (1970)
Nature 225, 26
- 32) Fellner, P. et al. (1973)
Biochimie
- 33) Felicetti, L., B. Colombo und C. Baghioni (1966)
Biochim. Biophys. Acta 119, 120
- 34) Fittler, F. und R. H. Hall (1966)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 25, 411

- 35) Fleissner, E. und E. Borek (1962)
Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 48, 1199
- 36) Gefter, M. L. (1969)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 36, 435
- 37) Gefter, M. L. und R. L. Russel (1969)
J. Mol. Biol. 39, 145
- 38) Gillam, J., S. Millward, D. Blew, M. V. Tigerstrom,
E. Wimmer und G. M. Tener (1967)
Biochemistry 6, 3043
- 39) Gillam, I., D. Blew, R. C. Warrington, M. V. Tigerstrom
und G. M. Tener (1968)
Biochemistry 7, 3459
- 40) Gold, M. et al. (1963)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 11, 107
- 41) Hacker, B. und L. R. Mandel (1969)
Biochim. Biophys. Acta 190, 38
- 42) Hall, H. (1971)
The modified Nucleosides in Nucleic Acids
(Columbia Univ. Press, New York)
- 43) Hayashi, Y., S. Osawa und K. Miura (1966)
Biochim. Biophys. Acta 129, 519
- 44) Hayashi, H., H. Fisher und D. Söll (1969)
Biochemistry 8, 3680
- 45) Henes, C., M. Krauskopf und I. Ofengand (1969)
Biochemistry 8, 3024

- 46) Hurwitz, I., M. Gold und M. Anders (1964)
J. Biol. Chem. 239, 3462
- 47) Jacob, F. und J. Monod (1961)
J. Mol. Biol. 3, 318
- 48) Johnson, L., H. Hayashi und D. Söll (1970)
Biochemistry 14, 2823
- 49) Jones, A. S. (1953)
Biochim. Biophys. Acta 10, 607
- 50) Keith, G., F. Picaud, I. Weissenbach, I. P. Ebel,
G. Pettrissant und G. Dirkheimer (1973)
FEBS-Letters 31, 345
- 51) Kelmers, A. D., C. W. Hancher, E. F. Phares
und C. D. Novelli (1971)
Methods Enzymology 20, 3
- 52) Kerr, S. und E. Borek (1972)
Advanc. Enzym. 36, 1
- 53) Kersten, W. et al. (1965)
Biochem. Z. 343, 423
- 54) Kersten, H. et al. (1967)
Hoppe-Seyler's Zeitschr. Physiol. Chem. 348, 1424
- 55) Kersten, H. et al. (1968)
Hoppe-Seyler's Zeitschr. Physiol. Chem. 349, 659
- 56) Khorana, H. G. et al. (1970)
Siehe Agarwal, K. L. (1970)

- 57) Klagsbrun, M. (1972)
J. Biol. Chem. 247, 7443
- 58) Klagsbrun, M. (1973)
J. Biol. Chem. 248, 2612
- 59) Kröger, H., et al. (1971)
Biochim. Biophys. Acta 240, 384
- 60) Kushino, Y. und S. Nishimura (1970)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 40, 306
- 61) Lakings, B. D. und C. W. Gehrke (1971)
J. Chromatogr. 62, 347
- 62) Lengyel, P. und D. Söll (1969)
Bacteriol. Rev. 33, 264
- 63) Lewis, I. B. und P. Doty (1970)
Nature 225, 510
- 64) Linkemann, K. (1971)
Dissertation
- 65) Littauer, U. Z. (1964)
Proc. 6th Intern. Congr. Biochem. 32, 11
- 66) Lodish, H. F. et al. (1971)
Biochemistry 10, 2348
- 67) Mandel, L. R. und E. Borek (1961)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 4, 14
- 68) Mandel, L. R. und E. Borek (1963)
Biochemistry 2, 560

- 69) Mandell, I. D. und A. D. Hershey (1960)
Analyt. Biochem. 1, 66
- 70) Mans, R. I. und G. D. Novelli (1961)
Arch. Biochem. Biophys. 94, 48
- 71) Markham, R. und I. D. Smith (1952 a)
Biochem. J. 52, 558
- 72) Markham, R. und J. D. Smith (1952 b)
Biochem. J. 52, 552
- 73) Meselson, M., R. Yuavi, J. Heywood (1972)
Ann. Rev. Biochem. 41, 447
- 74) Monier, R., M. L. Stephenson und P. C. Zamecnik (1960)
Biochim. Biophys. Acta 43, 1
- 75) Muench, K. H. und P. Berg (1966)
Biochemistry 5, 970
- 76) Nakada, D. (1965)
Biochim. Biophys. Acta 103, 455
- 77) Nirenberg, M. N. und J. H. Matthaei (1961)
Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 47, 1588
- 78) Nishimura, S. und J. B. Weinstein (1969)
Biochemistry 8, 832
- 79) Nishimura, S. (1971)
Proc. Nucl. Acid. Res. Vol. II, 542
- 80) Nishimura, S. (1972)
Progr. Nucl. Acid. Res. and Mol. Biol. 12, 49

- 81) Ofengand, J. und C. Henes (1969)
J. Biol. Chem. 244, 6241
- 82) Ogilvie, A. (1970)
Dissertation
- 83) Osawa, S. (1960)
Biochim. Biophys. Acta 43, 110
- 84) Osawa, S., E. Otaka, T. Jtoh und T. Fukui (1969)
J. Mol. Biol. 40, 321
- 85) Pearson, R. L., J. F. Weiss und A. D. Kelmers (1971)
Biochim. Biophys. Acta 228, 770
- 86) Peterkofsky, A., C. Jesensky, A. Bank und A. H. Mehler (1964)
J. Biol. Chem. 239, 2918
- 87) Petit, J. F., J. L. Strominger und D. Söll (1968)
J. Biol. Chem. 243, 757
- 88) Petrissant, G. (1973)
Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 71, 1046
- 89) Fillinger, D. J., J. Hay und E. Borek (1969)
Biochem. J. 114, 429
- 90) Piper, P. W. und B. F. C. Clark (1973)
FEBS-Letters 30, 265
- 91) Raettig, R. (1973)
Diplomarbeit
- 92) Rhajbandary, U. L., A. Stuart und S. H. Chang (1968)
J. Biol. Chem. 243, 584

- 93) Revel, M. und U. Z. Littauer (1966)
J. Mol. Biol. 15, 389
- 94) Rich, A. et al. (1973)
Science 179, 285
- 95) Roy, K. L., A. Bloom und D. Söll (1971)
Proc. Nucl. Acid. Res. Vol. II, 524
- 96) Sanger, F., G. G. Brownlee und B. G. Barrell (1965)
J. Mol. Biol. 13, 373
- 97) Schmidt, W. (1973)
Diplomarbeit
- 98) Scott, J. E. (1961)
Biochem. J. 81, 418
- 99) Scott, J. E. (1962)
Biochem. J. 84, 270
- 100) Shimizu, N., H. Hayashi, K. J. Miura (1970)
J. Biochem. 67, 373
- 101) Shugart, L., G. D. Novelli und M. P. Stuhlberg (1968)
Biochim. Biophys. Acta 157, 83
- 102) Sibatani, A. und N. Mizuno (1963)
Biochim. Biophys. Acta 76, 188
- 103) Simsek, M., J. Ziegenmeyer, J. Heckmann und
U. L. RajBhandary (1973)
Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 71, 1041
- 104) Singh, H. und B. G. Lane (1964)
Can. J. Biochem. 42, 87

- 105) Söll, D. (1971)
Science 173, 293
- 106) Söll, D. et al. (1969)
Siehe Hayashi H. et al. (1969)
- 107) Starr, J. L. (1963)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 10, 181
- 108) Steiner, F. E. (1968)
Dissertation
- 109) Stewart, T. S., R. J. Roberts und J. L. Strominger (1971)
Nature 230, 36
- 110) Strominger, J. L. (1968)
Siehe Petit, J. F. et al. (1968)
- 111) Strominger, J. L. (1971)
Siehe Stewart et al. (1971)
- 112) Svensson, J., H. G. Boman, K.G. Eriksson und
K. Kjellin (1963)
J. Mol. Biol. 7, 254
- 113) Svensson, J., G. R. Bjork und P. Lundahl (1969)
Eur. J. Biochem. 9, 216
- 114) Tai, Ph-Ch., B. J. Wallace und B. D. Davis (1973)
Biochemistry 12, 616
- 115) Takanami (1970 a)
Biochemistry 9, 3533
- 116) Takanami (1970 b)
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 179

- 117) Thiebe, R. und H. G. Zachau (1968)
Europ. J. Biochem. 5, 546
- 118) Tomlinson, R.V. und G.M. Tener (1963)
Biochemistry 2, 697
- 119) Vasquez, D. (1964)
Nature 203, 257
- 120) Vasquez, D. et al. (1969)
20th. Colloqu. Gesellsch. Biol. Chem. S. 100,
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York
- 121) Weil, J. H. und J. P. Ebel (1962)
Biochim. Biophys. Acta 55, 836
- 122) Wiley, P. F. et al. (1970)
- 123) Wolfe, A. D. und F. E. Hahn (1965)
Biochim. Biophys. Acta 95, 146
- 124) Yang, W. K. und G. D. Novelli (1968)
Biochim. Biophys. Res. Commun. 31, 534
- 125) Young, C. W. (1969)
Mol. Pharmacol. 2, 50
- 126) Yuki, A. (1971)
J. Mol. Biol. 62, 321
- 127) Zachau, H. G. (1969)
Angew. Chem. 81, 64

128) Zadrazil, S. (1972)

Synthetic. Proc. Nucl. Acid. Chem. Vol. II

129) Zamir, A., R.W. Holley und M. Marquisee (1965)

J. Biol. Chem. 240, 1267

Lebenslauf.

Am 22. April 1946 wurde ich, Hans-Henning Arnold, als erstes von vier Kindern des Majors a. D. und heutigen Industriekaufmanns Rudolf Arnold und seiner Ehefrau Ingrid, geborene Reifenrath, in Lauterburg bei Aalen geboren.

Von 1952 bis 1956 besuchte ich die Volksschule in Lauf bei Nürnberg. 1956 trat ich in das humanistische Gymnasium, am Frauentor in Nürnberg ein. Hier legte ich im Sommer 1965 das Abitur ab.

Das pharmazeutische Apothekenpraktikum absolvierte ich von September 1965 bis 1967 in der Burg-Apotheke in Nürnberg. Die pharmazeutische Vorprüfung bestand ich im September 1967.

Nach halbjähriger Apothekentätigkeit in Nürnberg begann ich im Sommersemester 1968 das Studium der Pharmazie an der Universität in Freiburg/ Breisgau und beendete dort das Studium im April 1971 mit dem pharmazeutischen Staatsexamen.

Die halbjährige Kandidatenzeit verbrachte ich in der Bindergass'-Apotheke in Nürnberg und erhielt am 12. Oktober 1971 die Approbation als Apotheker.

Am 23. Juli 1971 heiratete ich Fräulein Ingeborg Herrmann, pharmazeutisch-technische Assistentin aus Lauf.

Am 25. Februar 1972 kam meine Tochter Susanne zur Welt.

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Frau Prof. Dr. H. Kersten seit November 1971 am Institut für Physiologische Chemie der Universität Erlangen-Nürnberg erstellt.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hög, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990